

# **Imatinib-Resistenzen bei chronisch myeloischer Leukämie (CML)**

—

## **Zytogenetische und proteomische Untersuchungen zur Charakterisierung beteiligter Signaltransduktionsmechanismen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Julia Rosenhahn  
geboren am 27.02.1980 in Halle/Saale

Gutachter:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Datum der öffentlichen Verteidigung: \_\_\_\_\_

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,  
das gelöst werden will.  
(Galileo Galilei)

Für Jens, Ronja und meine Eltern

## **Danksagung**

PD Dr. Ferdinand von Eggeling danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in der AG CUCA, für seinen kühlen Kopf in hektischen Phasen, seine Übersicht und Organisation sowie die Korrekturen von Papern, Anträgen und natürlich dieser Arbeit.

Dr. Ivan Loncarevic danke ich für seine kreativen Ideen und die vielen guten Diskussionen und Gespräche.

PD Dr. Ignacio Rubio und Ute Wittig danke ich für die spannende Kooperation und die Unterstützung bei den Kinase-Assay-Versuchen.

Bei Frau Dr. Uta Hipler und dem Team der Hautklinik möchte ich mich für die Hilfe bei den Zellproliferationsversuchen bedanken.

Nicole Posorski danke ich für die Analyse meiner Klone mit der SNP-Array-Technologie.

Melanie Eberhard danke ich für die Durchführung der Raf-Sequenzierung und -Interaktionsstudien im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Meinen Dank geht auch an Susanne Michel, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, sowohl bei fachlichen als auch persönlichen Dingen und die ich seit ihrem Weggang aus der Humangenetik sehr vermisse. Herzlichen Dank auch für den Feinschliff der Summary.

Natürlich danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe CUCA für die offene und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre, in der aus Kollegen und Kolleginnen in den vier Jahren Freunde geworden sind.

Vor allem möchte ich Uli und Robert danken, deren helfende Hände ich mir während meiner Schwangerschaft und auch noch danach immer mal wieder borgen musste, um den einen oder anderen Versuch doch noch durchführen zu können.  
Auch fürs Korrekturlesen möchte ich Uli sehr danken.

Meinen Eltern Birgit und Steffen Rosenhahn danke ich für ihre Unterstützung, Interesse an meiner Arbeit und den Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen kann.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jens, der mir seit der Geburt von Ronja für jeden Termin und jede Besprechung den Rücken freigehalten hat und ohne den ich jetzt noch lange nicht fertig wäre.  
Unsere kleine Familie ist für mich das Allergrößte.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
2.1	Chronische myeloische Leukämie (CML): Charakteristika und Diagnostik .....	7
2.2	Entstehung und Eigenschaften des Philadelphia-Chromosoms und des BCR-ABL-Fusionsgens .....	8
2.3	Aufbau und Funktion der Fusionspartner BCR und ABL.....	9
2.4	Die Tyrosinkinase BCR-ABL und ihre assoziierten Signaltransduktionswege.....	11
2.4.1	Der Ras-MAPK-Signalweg.....	11
2.4.2	Der PI3-Kinase/AKT-Signalweg.....	12
2.4.3	Der S6-Kinase/mTOR-Signalweg.....	13
2.4.4	Der JAK/STAT-Signalweg.....	14
2.5	Therapie der chronischen myeloischen Leukämie .....	15
2.6	Mechanismen der Imatinib-Resistenz bei CML .....	16
2.7	Die CML-Zelllinie KCL22, ein Zellkulturmodell der Imatinib-Resistenz .....	17
<b>3</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
4.1	Arbeitsgeräte.....	20
4.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	22
<b>5</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>26</b>
5.1	Zellkultur.....	26
5.1.1	Zelllinien und Inhibitoren .....	26
5.1.2	Zellproliferationsanalysen und Apoptosemessung .....	26
5.1.3	Einzelzellkultivierung.....	27
5.2	Zytogenetische Methoden .....	27
5.2.1	Chromosomenpräparation und GTG-Bänderung.....	27
5.2.2	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung.....	28
5.2.3	Multicolor-Banding .....	28
5.3	Molekulargenetische Methoden .....	29
5.3.1	RNA-Isolation .....	29
5.3.2	cDNA-Synthese.....	29
5.3.3	Quantitative PCR .....	29
5.3.4	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten .....	30
5.3.5	SNP-Analysen.....	32
5.4	Proteomische Methoden.....	33
5.4.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	33
5.4.2	Eindimensionale Gelelektrophorese (1-DE) .....	34
5.4.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) .....	35
5.4.4	Proteinfärbung mit Coomassie und Silber.....	35
5.4.5	Identifizierung durch Peptide Mass Fingerprint .....	36
5.4.6	Western Blot .....	37
5.4.7	Massenspektrometrie mittels SELDI-TOF-MS.....	37
5.4.8	Immunpräzipitation (IP) .....	38
5.4.9	Herstellung rekombinanter Proteine .....	39
5.4.10	Enzymaktivitätsassays.....	40
5.5	Statistik .....	41

<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
6.1	Beweis der Imatinib-Resistenz der Zelllinie KCL22-R sowie Ausschluss von bekannten Resistenzmechanismen .....	42
6.1.1	Zellproliferation und Apoptose.....	42
6.1.2	BCR-ABL-Expression, Sequenzierung der ATP-Bindestelle und Suche nach FLT-3-Mutationen.....	43
6.1.3	Analyse der BCR-ABL-Auto-Phosphorylierung.....	44
6.2	Analyse der chromosomalen Veränderungen .....	45
6.2.1	M-FISH .....	45
6.2.2	Multicolor-Banding .....	46
6.2.3	Interphase-FISH.....	47
6.2.4	SNP-Array-Analysen.....	49
6.3	Analyse der proteomischen Veränderungen .....	51
6.3.1	Massenspektrometrische Untersuchungen (SELDI).....	51
6.3.2	Aufreinigung nach isoelektrischem Punkt und eindimensionale Gelelektrophorese (1DE).....	54
6.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE).....	55
6.3.4	Verifizierung der identifizierten Proteine mittels Western Blot.....	56
6.4	Analyse der BCR-ABL-assoziierten Signalwege .....	57
6.4.1	Untersuchung des MAPK-Signalweges.....	58
6.4.2	Der p70-S6K/mTOR Signalweg und PI3-Kinase/AKT Signalweg .....	63
6.4.3	Kombination von CI-1040, Rapamycin, LY294002 und Imatinib .....	65
6.4.4	Auto- und Parakrine Faktoren.....	66
<b>7</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
7.1	Beweis der Imatinib-Resistenz von KCL22-R.....	69
7.2	Chromosomale Aberrationen der Zelllinien KCL22-S und -R .....	70
7.3	Unterschiede in der Proteinexpression von KCL22-S und -R .....	71
7.3.1	Identifizierung von RAB7B als Marker für KCL22-R mittels SELDI und Q-PCR .....	72
7.3.2	Gelbasierte Identifizierung von sieben differentiell exprimierten Proteinen .....	73
7.4	Analyse der BCR-ABL-assoziierten Signalwege .....	78
7.4.1	Die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges in KCL22-R und seine Rolle für die Imatinib-Resistenz .....	78
7.4.2	Die Relevanz des p70-S6K/mTOR Signalweges und PI3-Kinase/AKT Signalweges.....	80
7.4.3	Ist die Imatinib-Resistenz durch parakrine Faktoren vermittelbar? .....	81
7.5	Zusammenfassung der beteiligten Signalwege im Kontext der chromosomalen Veränderungen.....	83
<b>8</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>87</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	87
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	87
9.3	Tabellenverzeichnis .....	89
9.4	Literaturverzeichnis .....	90
<b>10</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>98</b>
<b>12</b>	<b>LISTE WISSENSCHAFTLICHER VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>99</b>
<b>13</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>100</b>
13.1	Ergebnisse der Sequenzierung von BCR-ABL und Raf.....	100
13.1.1	BCR-ABL.....	100
13.1.2	B-Raf und C-Raf.....	101
13.2	Tabellen.....	101

## 1 Zusammenfassung/ Summary

Obwohl Tyrosinkinaseinhibitoren die Therapie von chronischer myeloischer Leukämie und anderen Erkrankungen wie gastrointestinalen Tumoren revolutioniert haben, ist die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesen neuen Medikamenten ein zunehmendes Problem für Patienten und Ärzte und die Überwindung dieser Resistenzen eine Herausforderung für die Wissenschaft.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Imatinib-Resistenz anhand eines Zellkulturmodells mit zytogenetischen, molekulargenetischen und proteomischen Methoden untersucht. Die verwendete Zelllinie gilt als initial Imatinib-resistent, d. h. sie zeigte von Beginn an kein Ansprechen auf die Imatinib-Therapie. Die Resistenz wurde also nicht erst durch kontinuierlich steigende Dosen des Medikaments erzeugt, was in vivo einer unter der Therapie erworbenen Resistenz entsprechen würde. Diese initial resistente Zelllinie wurde subkloniert, es wurden sensitive (KCL22-S) und resistente (KCL22-R) Klone isoliert und auf den genannten drei Ebenen miteinander verglichen, um Ursachen für die Resistenz zu finden.

Die Arbeit gliedert sich in drei Teile: 1. Chromosomale Charakterisierung, 2. Proteomische Analyse differentiell exprimierter Proteine und 3. Analyse der BCR-ABL-assoziierten Signalwege. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsbereiche sowie deren Bedeutung im Kontext der aktuellen Literatur werden im Folgenden besprochen.

Im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen konnten wir bekannte Resistenzmechanismen wie eine BCR-ABL-Überexpression oder Mutationen in der ATP-Bindestelle oder im FLT-3-Gen als Ursache ausschließen, sowohl in KCL22-S als auch in KCL22-R kann die BCR-ABL-Autophosphorylierung durch Imatinib wirksam verhindert werden.

Im ersten Teil der Arbeit konnte zytogenetisch und molekularzytogenetisch nachgewiesen werden, dass sich die resistente Zelllinie hauptsächlich durch zwei Aberrationen von der sensitiven Zelllinie unterscheidet. In KCL22-R wurde eine Tetrasomie für Chromosom 8 gefunden, während die sensitive Zelllinie für dieses Chromosom di- bzw. trisom war. Eine wichtige strukturelle Aberration wurde am Chromosom 6 gefunden, an welches bei der resistenten Zelllinie unterschiedlich große Anteile von Chromosom 13 (13q12→ter) angelagert waren. Ein Anteil der resistenten Zellen weist daher eine Monosomie für den genannten Bereich auf. In Interphase-FISH-Experimenten mit einer Sonde für den Bereich 13q14, in dem das Rb-Gen, ein wichtiges Tumorsuppressorgen, liegt, konnten wir zeigen, dass die Zellen, die eine Monosomie für 13q14.3 zeigen, Imatinib-sensitiver sind, als der Teil der resistenten Zellen, die eine Disomie zeigen. Die genauere Analyse des fraglichen chromosomalen Abschnittes mittels SNP-Analyse ergab den Verlust eines über 80 MB-großen Fragments mit dem Bruchpunkt in 13q13.1, in dem eine Vielzahl von Genen liegen, jedoch keines, welches mit den Ergebnissen aus den anderen Untersuchungsteilen in Verbindung steht und somit für die Vermittlung des beobachteten Effekts in Frage kommt.

Anschließend konnten auf proteomischer Ebene eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die für die Imatinib-Resistenz eine Rolle spielen könnten. Durch die Verwendung unterschiedlichster Techniken wie Massenspektrometrie (SELDI), ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese sollte ein möglichst breites Spektrum von Kandidaten abgedeckt werden. Folgende Proteine wurden mehrfach mit verschiedenen Gelbasierten Techniken als differentiell exprimiert detektiert: Enolase (überexprimiert in KCL22-R), Carbonic Anhydrase (R), hnRNP A2/B1 (R), HSP27 (S) und HSP70 (R) sowie Vimentin (S). Die Enolase wirkt als Heat-Shock-Protein. Die Überexpression ist



wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Imatinib-Therapie zu sehen, da die Expression nach Imatinib-Gabe zunimmt. Die Carbonic Anhydrase spielt eine Rolle bei der Azidifizierung des Extrazellularraums, welche das Tumorstadium beschleunigt. Die Überexpression von hnRNP A2/B1 in KCL22-R scheint eher die Folge der konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges zu sein als die Ursache der Resistenz selbst. Die Heat Shock Proteine 27 und 70 wirken entgegengesetzt auf die Differenzierung der Zellen. Während HSP27 die Differenzierung von Zellen fördert, hemmt HSP70 sie und führt somit zu fortwährender Teilung der Zellen. Über die Kombination von SELDI und qRT-PCR konnte das kleine G-Protein RAB7B in KCL22-R deutlich überexprimiert nachgewiesen werden, die Expression verstärkt sich unter Imatinib-Therapie noch. RAB7B spielt eine Rolle bei der lysosomalen Degradierung von Proteinen. Möglicherweise kommt es in der resistenten Zelllinie zum verstärkten Abbau von Proteinen, die Apoptose und Zelldifferenzierung fördern. Alle gefundenen Marker stehen somit in einem gewissen Kontext zur physiologischen Situation und könnten, vor allem in Kombination, zur Entstehung der Resistenz beitragen oder diese sogar bedingen.

Der aussichtsreichste Ansatzpunkt ist wohl der der Untersuchung der BCR-ABL-assoziierten Signalwege. Ausgehend davon, dass die resistenten Zellen trotz blockiertem BCR-ABL weiterhin proliferieren können, stand die Frage im Raum, welche Signalmoleküle die Funktion von BCR-ABL ersetzen können und wie das mögliche Umschalten auf andere Signalwege gesteuert wird. Wir konnten eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges in den resistenten Zellen nachweisen, die auf eine dauerhafte Aktivität der Raf-Kinasen zurückzuführen war, während sich Ras selbst als übergeordnetes Molekül dieses Signalweges als Imatinib-sensitiv erwies. Durch die kombinierte Therapie mit Imatinib und dem spezifischen Mek-Inhibitor CI-1040 konnte in den resistenten Zellen ein Proliferationsstop, jedoch keine Apoptose ausgelöst werden. Expressionsunterschiede von C-Raf, B-Raf und Erk als Ursache der dauerhaften Aktivität können wir ausschließen. Jedoch ergab eine Interaktionspartnersuche von B- und C-Raf interessante Ansatzpunkte. So konnten wir das Heat Shock Protein 90 und das Zytoskelettprotein Vimentin als Interaktionspartner von C-Raf nachweisen. Möglicherweise stabilisiert HSP90 C-Raf in KCL22-R länger als in KCL22-S und bedingt somit die erhöhte Aktivität. Vimentin wurde nicht nur als Interaktionspartner von C-Raf, sondern auch als vermindert exprimiert in KCL22-R gefunden. Es kann postuliert werden, dass Vimentin über die Bindung an 14-3-3-Proteine diese für andere Targets wie auch Raf blockiert und somit deren Aktivierung verhindert. Eine Überexpression von Vimentin in KCL22-S würde somit zu einer verringerten C-Raf-Aktivität führen, was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Auch weitere gefundene Interaktionspartner von Raf tragen zu einer gesteigerten Aktivität des MAPK-Signalweges bei. Die gleichzeitige Blockierung des S6-Kinase/mTOR-Signalweges und von BCR-ABL konnte das Wachstum der resistenten Zellen um 75 % verringern und deutet auf eine Beteiligung dieses Signalweges bei der Erlangung der Imatinib-Resistenz von KCL22-R hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges das Kernelement der Imatinib-Resistenz bei der CML-Zelllinie KCL22-R ist. Die gleichzeitige Blockierung des MAPK-Signalweges mit dem spezifischen Inhibitor CI-1040 und von BCR-ABL mit Imatinib stellt somit einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie von Imatinib-resistenten Patienten dar.

## Summary

Imatinib and other newly established tyrosine kinase inhibitors are powerful tools for the therapy of chronic myeloid leukemia (CML), but 20% of the affected patients do not respond to this kind of medication. Therefore new strategies have to be developed by the involved scientists and physicians to overcome this resistance. We studied the Imatinib resistance by means of the CML-cell line KCL22. This cell line was found to be initially resistant to Imatinib, but nevertheless, a few sensitive clones could be isolated from the parental cell line by the group of Junia Melo. To analyse the possible decisive differences between these two phenotypes, the features of the Imatinib resistant and sensitive clones (named KCL22-R and KCL22-S) were compared using cytogenetic and proteomic tools as well as techniques which address the signalling pathway network. The thesis presented here is therefore organized in three parts: 1. Analysis of chromosomal aberrations, 2. Proteomic profiling and 3. Examination of signalling pathways connected to BCR-ABL. Common resistance mechanisms like mutations in the ATP-binding site or in the FLT3-gene and BCR-ABL overexpression could be excluded for KCL22-S and -R. BCR-ABL auto-phosphorylation was blocked in both, KCL22-S and -R after treatment with 1  $\mu$ M Imatinib. Consequently, we expect a BCR-ABL independent mechanism as a reason for the resistance.

As one result of the first part of our study the cytogenetic analysis revealed a tetrasomy 8 and a non-reciprocal translocation +der(6)t(6;13)(p11.1;q12) in KCL22-R as new evolved aberrations. Chromosome der(6)t(6;13) showed four variants differing in the chromatin content of 13q14-13qter including the Rb gene. Due to these sub-clones, about 70 % of the Imatinib treated KCL22-R cells showed a disomy and 30 % a monosomy for 13q14. Imatinib removal reduced the main clone to about 20 % for the benefit of the monosomic sub-clones. This was accompanied by an increased apoptosis rate but was revertible by Imatinib re-treatment. This effect may be connected with genes located in 13q14-qter. Subsequent SNP array analyses showed a loss of 80 kb and detected the exact breakpoint at 13q13.1.

For the comparative analysis of the protein profile of KCL22-S and -R a combination of mass spectrometry (MS) and gel based methods was used to reach a broad spectrum of possible marker proteins. By gel based approaches and peptide mass fingerprint (PMF) we found the proteins enolase (overexpressed in KCL22-R), carbonic anhydrase (R), hnRNP A2/B1 (R), HSP27 (S), HSP70 (R) and vimentin (S) as discriminating between the two cell lines. The small G-protein RAB7B was identified after MS and found 87-fold overexpressed in KCL22-R by qRT-PCR. Furthermore, the mRNA-expression of RAB7B was increased after Imatinib therapy in both KCL22-S and -R. Similar results were obtained for the enolase which was also overexpressed in KCL22-R. As enolases could act as heat shock proteins, it is not surprising that their expression levels were increased after Imatinib treatment. The carbonic anhydrase catalyse a chemical reaction which leads to an acidification of the extracellular space. This could promote tumor cell proliferation. An overexpression of hnRNP A2/B1, as detected in KCL22-R is probably caused by the constitutive activation of the MAPK pathway and is therefore not seen as a reason for the Imatinib resistance of KCL22-R. The heat shock proteins 27 and 70 have opposite effects on cell differentiation. HSP27 is known to be a promoter of cell differentiation while HSP70 inhibits differentiation which could lead to tumor cell proliferation. RAB7B is involved in the lysosomal

degradation of proteins. Overexpression of RAB7B in KCL22-R could promote degradation of e.g. pro-apoptotic proteins.

Finally the analysis of the key signaling pathways revealed the MAPK pathway as important for the survival of KCL22-R. The simultaneous treatment of resistant cells with Imatinib and the Mek inhibitor CI-1040 led to a block in proliferation. Therefore it could be stated that the MAPK signalling pathway is involved in the acquisition of Imatinib resistance. We showed that Erk activity in the resistant clone could not be compromised by Imatinib doses that fully repressed Erk activation in the sensitive KCL22 cells. A systematic analysis of the upstream MAPK pathway demonstrated the inhibition of Ras-GTP accumulation by Imatinib in resistant KCL22 cells, while B-Raf and C-Raf activity was largely resistant to the drug's action. Sequencing of the kinase domains of both C-Raf and B-Raf showed no constitutive activating mutations in either kinase. The analysis of the protein interaction network of the Rafs revealed some interesting candidates for interaction partners which may play a role in the increased activity of the Rafs. Among others vimentin was found overexpressed in KCL22-S and also as an interaction partner of C-Raf. It is described that vimentin binds to 14-3-3 proteins and therefore prevents the binding and activation of other proteins like Raf. Furthermore, HSP90 was found as an interaction partner of C-Raf and in its function as a chaperon HSP90 is able to stabilize proteins. Maybe this could be a mechanism to extend C-Raf activity in KCL22-R.

In summary, our studies could highlight a novel mechanism of Imatinib resistance in CML cells based on the non-mutational aberrant activation of Raf. Our results may prove helpful for a better functional classification of Imatinib-resistance in CML and to develop new therapeutic strategies.

## 2 Einleitung

### 2.1 Chronische myeloische Leukämie (CML): Charakteristika und Diagnostik

In Deutschland erkranken jährlich 1000 Menschen neu an chronischer myeloischer Leukämie (CML), damit macht die CML ca. 20 % der Leukämieerkrankungen aus (1) und ist unter den myeloproliferativen Erkrankungen am weitesten verbreitet. Die Erkrankung tritt im späteren Erwachsenenalter auf, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Es sind keine ethnischen oder regionalen Unterschiede in der Inzidenz bekannt. Als Risikofaktoren gelten ionisierende Strahlung sowie Chemikalien wie Benzol. Pathognomisch für die CML ist die Fusion der Gene BCR und ABL (2), die hauptsächlich durch eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht. Das sogenannte Philadelphia-Chromosom wurde erstmals 1960 beschrieben (3). Die Rolle der BCR-ABL-Genfusion wird im nachfolgenden Kapitel detailliert beschrieben.

Die CML kann in drei Stadien eingeteilt werden. In der sogenannten chronischen Phase, die sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren erstrecken kann, bleibt die Krankheit meist unentdeckt oder wird bei Routine-Untersuchungen des Blutes entdeckt. Im Blut kann eine Zunahme der weißen Blutkörperchen nachgewiesen werden ( $>10.000/\text{mm}^3$ ), die Patienten sind allgemein müde und nicht mehr so leistungsfähig. Teilweise sind hier schon unreife Vorstufen der myeloiden Reihe nachweisbar, was als sogenannte Linksverschiebung bezeichnet wird, es ist jedoch kein Reifungsstopp in den neoplastischen Zellen nachweisbar, wie er bei akuten Leukämien zu beobachten ist (4). In der sich anschließenden Akzelerationsphase beginnen die vermehrt produzierten Leukozyten zunehmend, die übrigen Blutbestandteile wie Erythrozyten und Blutplättchen zu verdrängen, die Patienten zeigen eine erhöhte Blutungsneigung, sind blass und leiden häufig unter starken Kopfschmerzen. Auch sinkt der Anteil an reifen, funktionsfähigen Leukozyten immer mehr ab, was sich in erhöhter Infektanfälligkeit bemerkbar macht. In der dritten Phase, den Blastenschub, kommt es zur deutlich verstärkten Ausschwemmung von unreifen Leukozyten (Blasten) aus dem Knochenmark ins Blut ( $> 20\%$  Blasten). In dieser Phase gleicht die Leukämie einer akuten Form und führt unbehandelt rasch zum Tod ([www.kompetenznetz-leukaemie.de](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de)).

Zur Diagnose der CML wird zunächst ein Blutbild erstellt. Bei Verdacht auf eine CML wird eine Chromosomenanalyse der Blutzellen zum Nachweis der Translokation  $t(9;22)$  durchgeführt. Der Anteil der Tumorzellen im Blut oder Knochenmark kann einerseits mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt werden, bei der Sonden, die gegen ABL und BCR gerichtet sind, auf Metaphase-Platten oder Interphase-Kerne hybridisiert werden. Liegt eine Genfusion vor, kann ein gelbes Fusionsignal sowie rote und grüne Signale für die intakten Chromosomen 9 und 22 detektiert werden. In gesunden Zellen findet man zwei rote und zwei grüne Signale. Diese Methode wird auch angewendet, um den Erfolg einer Therapie zu überprüfen (5). Andererseits kann auch mit molekulargenetischen Methoden der Anteil der Tumorzellen bestimmt sowie das Therapieansprechen kontrolliert werden. Durch den Einsatz der real time PCR wird die Menge des BCR-ABL-Transkripts im Vergleich zu einem Referenzgen bestimmt (6). Diese Methode ist in der Handhabung einfacher und kostengünstiger als die FISH, jedoch muss die Aussagekraft dieser Methode kritisch betrachtet werden. Das BCR-ABL-Expressionsniveau kann nicht direkt mit der Anzahl der Tumorzellen korreliert werden, da auch eine geringe Anzahl an Tumorzellen viel BCR-ABL produzieren können und umgekehrt trotz niedrigem BCR-ABL-Expressionsniveau viele

Tumorzellen mittels FISH nachweisbar sind (7). Um dieses Problem zu lösen, wäre die Verwendung eines Referenzgenes, welches ausschließlich in den Tumorzellen vorkommt, hilfreich. Jedoch konnte das reziproke Translokationsgen ABL-BCR auf dem Chromosom 22 nicht verwendet werden, da es auf einem zu niedrigen Niveau exprimiert wird und zudem bei ca. 20 % der Patienten gar nicht nachweisbar ist (8).

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss von individuellen Parametern auf die Prognose der Erkrankung untersucht. Von verschiedenen Gruppen wurden sogenannte *staging systems* erstellt, die Patienten je ihren Eigenschaften in Risikogruppen einsortieren, die eine unterschiedlich lange Überlebenszeit haben. Nach Tura (9) und Cervantes (10) wurde zunächst der sogenannte Sokal-Index (11) verwendet, der sich gut für Patienten eignete, die mit Busulfan oder Hydroxyurea behandelt wurden (12), jedoch nicht für neuere Behandlungsmethoden wie IFN $\alpha$  (s. 2.5). Der Index nach Kantarjian teilte die Patienten statt drei in vier Risikogruppen ein (13). Da sich dieses System auf eine Studie mit deutschen Patienten nicht anwenden ließ, wurde 1998 von Hasford et al. (12) ein verbessertes System für die Charakterisierung von IFN-behandelten Patienten eingeführt. Danach haben Alter, Geschlecht, die Milzgröße sowie die Anzahl der weißen Blutkörperchen im Blut und der Prozentsatz der Blasten im Knochenmark einen signifikanten Einfluss auf die Prognose. Neuere Untersuchungen zeigen, dass seit der Einführung von Imatinib vor allem das Erreichen eines vollständigen zytogenetischen Ansprechens für das Langzeitüberleben von Bedeutung ist (14).

## 2.2 Entstehung und Eigenschaften des Philadelphia-Chromosoms und des BCR-ABL-Fusionsgens

Durch die reziproke Translokation zwischen den q-Armen der Chromosomen 9 und 22 kommt es zur Genfusion von BCR und ABL (Abb. 1) und somit zur Entstehung des sogenannten Philadelphia-Chromosoms. Für das Chromosom 9 wurde der Bruchpunkt in 9q34, für das Chromosom 22 in 22q11 nachgewiesen (15).

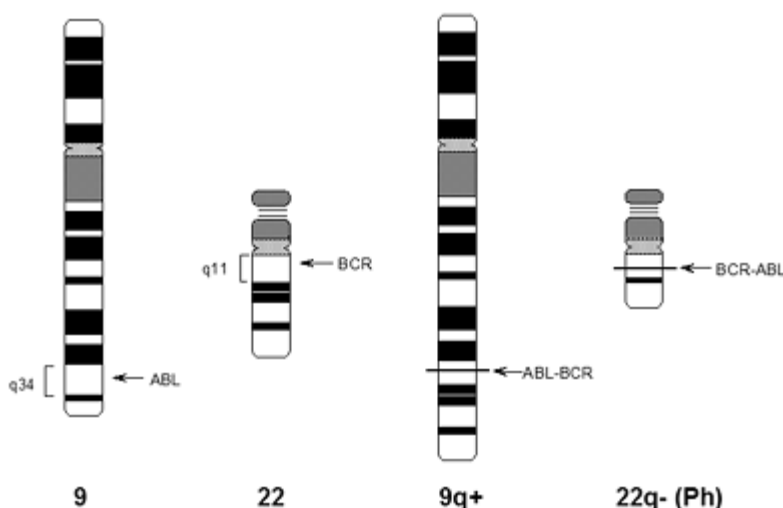


Abb. 1: Reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, es entsteht das sogenannte Philadelphia-Chromosom mit der BCR-ABL-Genfusion und das reziproke derivative Chromosom 9 mit der ABL-BCR-Genfusion ([www.onkodin.de](http://www.onkodin.de)).

Auf DNA-Ebene wurden sowohl innerhalb des ABL-Gens als auch innerhalb des BCR-Gens verschiedene Bruchpunkte detektiert (Abb. 2). Bei chronischer myeloischer Leukämie befindet sich der Bruchpunkt im ABL-Gen häufig zwischen Exon a1 und Exon a2, dadurch ist das Exon 1a seltener in die Fusion involviert. Im BCR-Gen ist häufig die M-BCR (major breakpoint cluster

region, Exon b2 = Exon 13 und b3 = Exon 14) betroffen. Es entstehen unterschiedlich große Fusionsgene (c1a2, b2a2, b3a2 und e19a2), die wiederum die Expression von verschiedenen großen Proteinen bedingen. Bei CML entstehen vor allem die Fusionsgene b2a2 und b3a2, daher wird vor allem die 210 kDa-große Form der BCR-ABL-Tyrosinkinase exprimiert (16). Welcher Bruchpunkt vorliegt, hat für die Individualprognose keine Bedeutung (17).

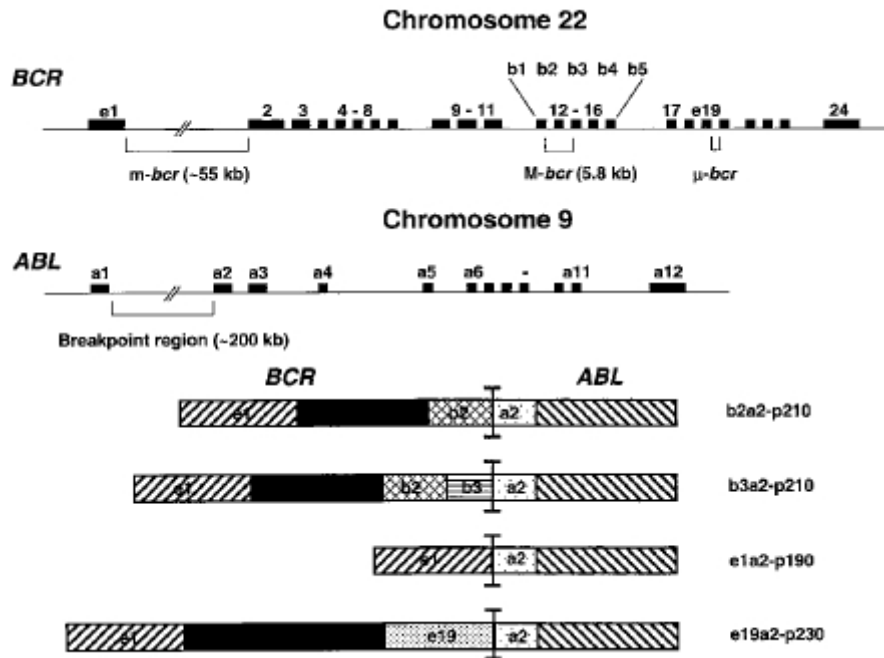


Abb. 2: Bruchpunkte in den Genen BCR und ABL sowie entstehende Fusionsgene (aus Wang et al. 5).

### 2.3 Aufbau und Funktion der Fusionspartner BCR und ABL

Das BCR-Gen (Breakpoint Cluster Region) ist 130 kb groß, besteht aus 23 Exons (18) und kodiert neben einem 130 kDa-Protein für eine 160 kDa-Serin-Treonin-Kinase, die im Zytoplasma lokalisiert ist (19). Wie in Abb. 3 gezeigt, codiert das Exon 1 des BCR-Gens für die Oligomerisierungsdomäne, die Kinasedomäne und für SH2-bindende Domänen, über die die Protein-Interaktionen erfolgen (20). Eine wichtige Interaktion findet über den Tyrosinrest 177 mit GRB-2 statt, einem Aktivator des Ras-Signalweges (21). N-terminal ist eine coiled-coiled-Domäne enthalten, die zur Homotetramerisierung von BCR wichtig ist. C-terminal befindet sich eine dbl- und eine Pleckstrin-Domäne. Über die dbl-Domäne wird ein GTP/GDP-Austausch an Rho-GEF stimuliert, über die nachfolgend der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert werden kann (22). Außerdem ist am C-Terminus eine GTPase-Aktivität für p21<sup>Rac</sup>, einer kleinen GTPase der Ras-Familie, enthalten (20;22). Einziges bekanntes Substrat von BCR ist Bap1 (23).



Abb. 3: Domänen von BCR (24), Abkürzungen sind im Text beschrieben.

Das ABL-Gen (Abelson) ist 230 kb groß, besteht aus 11 Exons und kodiert für eine 145 kDa große Non-Rezeptor-Tyrosinkinase. Sie ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert (25) und ihre Aktivität wird in sehr engen Grenzen reguliert. Das ABL-Protein besitzt am N-Terminus drei *src* homology-(SH)-Domänen (26). Die SH1-Domäne kodiert für die Tyrosinkinaseaktivität, die SH2-

Domäne bindet an Phosphotyrosinreste und die SH3-Domäne bindet an Prolin-reiche Regionen. Am C-terminalen Ende befindet sich das *nuclear localisation signal* (NLS) (25), Prolin-reiche Regionen (27), die für die Bindung an Adaptermoleküle wichtig sind, eine DNA- und p53- sowie eine Aktin-Bindestelle (28-30), (Abb. 4). Die SH3-Domäne ist wahrscheinlich für die Regulation der Kinaseaktivität von Bedeutung. Wahrscheinlich bindet die SH3-Domäne an Teile von ABL selbst (CID = *cis inhibitory domain*) und reguliert so die Aktivität der Kinase (31). Die SH2-Domäne ist verantwortlich für die Substratspezifität der Tyrosinkinase, da hier die Bindung an Phosphotyrosinreste erfolgt (22). Wird die SH2-Domäne entfernt, können die spezifischen Substrate nicht mehr phosphoryliert werden (32). DNA-Schädigung durch Strahlung oder Chemikalien führt zur Aktivierung von ABL (33). Die ABL-Aktivierung findet unterhalb von ATM (Ataxia-Telangiectasia Protein) und oberhalb von p53 statt (34). Wird ABL infolge DNA-Schädigung durch ATM am Serin 465 phosphoryliert, bindet ABL p53 und erhöht so die transkriptionelle Aktivität von p53 für Targetgene wie p21 (29). Weiterhin bindet ABL an die DNA-abhängige-Proteinkinase, die an DNA-Reparatur und -Rekombination beteiligt ist (35). Außerdem steigt die Kinaseaktivität während des Zellzyklus am Übergang zur S-Phase an (36). In der G1-Phase bildet ABL einen Komplex mit dem Pocket-Protein Rb (Abb. 5), was zur Inhibition der Kinaseaktivität von ABL führt. Im späten G1-Stadium wird Rb durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert, der Komplex mit ABL zerfällt und ABL ist aktiv (37). Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion lässt ABL aus dem Zellkern ins Zytoplasma wandern, dabei erhöht sich seine Kinase-Aktivität (38).

#### b p145<sup>Abl</sup>



Abb. 4: Domänen von ABL (24). Erklärung der Abkürzungen im Text.

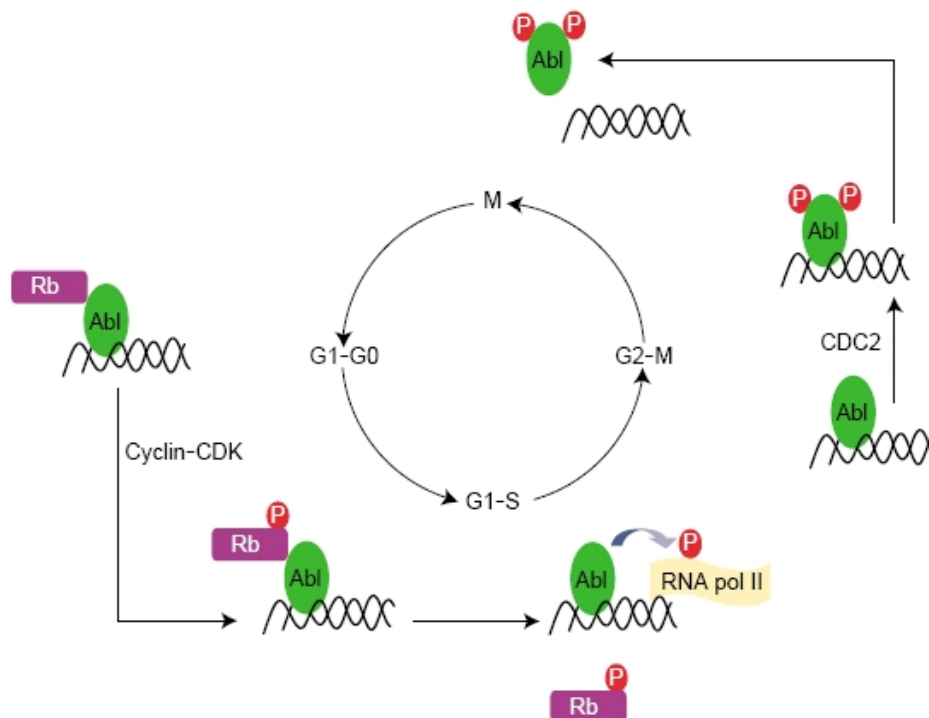


Abb. 5: ABL-Aktivierung während des Zellzyklus (24).

## 2.4 Die Tyrosinkinase BCR-ABL und ihre assoziierten Signaltransduktionswege

Durch die bereits in der hämatologischen Stammzelle entstehende Translokation zwischen BCR und ABL resultiert die Expression des BCR-ABL-Fusionsproteins, einer dauerhaft aktiven Tyrosinkinase. Obwohl auch BCR-ABL wie ABL selbst die NLS-Domäne enthält, ist sie ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Als Ursache dafür wird die verstärkte Bindung an F-Aktin diskutiert (20), welche durch die Tetramerisierung aktiviert wird (30). Die Homotetramerisierung wird durch die N-terminale coiled-coiled-Domäne des BCR ermöglicht (39) und ist auch wichtig für die konstitutive Aktivierung von BCR-ABL (40) und die Interaktion mit Proteinen, die SH2-Domänen enthalten (41). Die Kinaseaktivität ist, anders als bei ABL, nicht mehr durch DNA-Schäden auslösbar (42).

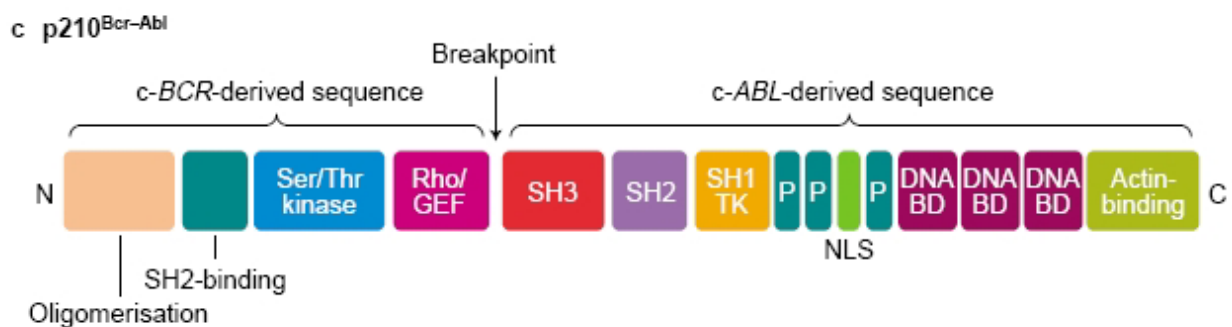


Abb. 6: Domänen des BCR-ABL-Fusionsgens (24).

Über seine verschiedenen Domänen interagiert BCR-ABL mit einer Reihe von Signalwegen (Abb. 10). Auf die wichtigsten Wege, welche für die transformierenden Eigenschaften von BCR-ABL von Bedeutung sein können, wird im Folgenden näher eingegangen.

### 2.4.1 Der Ras-MAPK-Signalweg

BCR-ABL rekrutiert Adaptermoleküle, wie Grb-2, CRKL und SHC, die SH2- und SH3-Domänen enthalten, um an Ras zu binden (43). Dabei spielt vor allem der Tyrosinrest 177 im BCR, der durch die konstitutive Aktivierung von BCR-ABL dauerhaft phosphoryliert ist, eine wichtige Rolle. Der Komplex aus Adaptermolekülen und BCR-ABL fördert den Austausch von GDP zu GTP im Ras-Protein, es kommt zu einer Akkumulation von aktivem Ras. Ausgehend von Ras werden drei verschiedene MAPK-Signalwege (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) aktiviert (Abb. 7 links). Zum einem wird über die Serin/Threonin-Kinase Raf die Dual-spezifische Kinase Mek phosphoryliert, die wiederum die Serin/Threonin-Kinase Erk (Extrazellulär regulierte Kinase) aktiviert. Erk wiederum wird nach Aktivierung in den Nukleus transloziert und aktiviert unter anderem Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, wodurch die Transkription von sogenannten *immediate early*-Genen und *delayed early*-Genen gesteuert wird. Als Konsequenz erfolgt die Expression eines Cyclin D/CDK4/6-Komplexes, der Rb inhibiert und so über eine Aktivierung von E2F zum Übergang von G1- zur S-Phase führt (44). Der SAPK-Signalweg (Stress-aktivierte Protein Kinase) führt über die Aktivierung von MEKK, SEK und SAPK/JNK. BCR-ABL kann über Ras, MEKK und SAPK die Jun-Kinase aktivieren. Als drittes wird der p38-Kinase-Signalweg über Ras gesteuert. Interessanterweise scheint die Aktivierung von c-Raf nicht zwangsläufig zu einer Phosphorylierung von Erk zu führen (45). Als weiteres Target von Raf wird Bad beschrieben, ein pro-apoptotisch wirkendes Protein, welches über ein Interleukin-3-Signal (IL-3) angesteuert wird. Möglicherweise spielen aber auch Phosphatasen, die speziell auf Erk oder SAPK wirken, eine Rolle. Zusätzlich ist



beschrieben, dass es einen Link vom Ras-MAPK-Signalweg zum S6-Kinase/mTOR-Weg gibt, denn auch Erk kann die Aktivität der S6-Kinase beeinflussen (46).

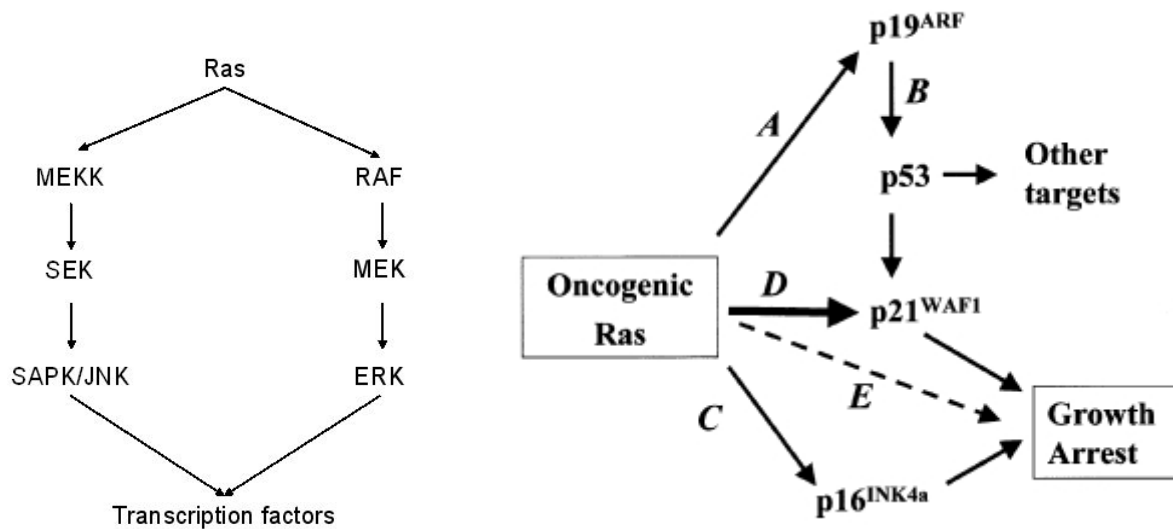


Abb. 7 links: Signalwege, die über Ras gesteuert werden (36). Rechts: Ras-vermittelter Zellzyklus-Arrest (47).

Ras kann aber auch negative Effekte auf die Zellproliferation haben. In primären Zellen wird, wie in Abb. 7 rechts dargestellt, der antiproliferative Effekt über CDK-Inhibitoren vermittelt, wobei die Signalwege  $p19^{\text{ARF}}$ -p53,  $p16^{\text{INK4a}}$ -Rb und der p53-unabhängige  $p21^{\text{WAF1}}$ -Signalweg eine Rolle spielen (48). Diese drei Signalwege führen zu einer Rb-Phosphorylierung, p53-Induktion und zu einer p53-unabhängigen p21-Hochregulation. In CML-Zellen verhindert Ras, vor allem in der mutierten Form, über die Induktion von  $p21^{\text{WAF1}}$ , welche p53-abhängig oder unabhängig sein kann (Abb. 7), das Wachstum durch Zellzyklus-Arrest (47). Dieser Effekt wird durch die Überexpression von c-myc aufgehoben (49).

#### 2.4.2 Der PI3-Kinase/AKT-Signalweg

Die PI3-Kinase besteht aus einem Heterodimer aus einer regulatorischen p85-Untereinheit und einer katalytischen p110-Untereinheit, die in der Lage ist, sowohl Proteine als auch Lipide zu phosphorylieren (36). Die p85-Untereinheit bildet über CBL und CRKL einen Komplex mit BCR-ABL (50) und wird dabei phosphoryliert (Abb. 8 A). CRKL, welches Zellmotilität und Integrin-vermittelte Zelladhäsion reguliert, bindet an die SH3-Domäne von BCR-ABL, wird aber auch selbst von ABL phosphoryliert (51). Alternativ kann die PI3-Kinase auch über Ras, Src und IRS-1 aktiviert werden (Abb. 8, 52). Die Aktivierung der PI3-Kinase führt zur vermehrten Bildung von *second messenger*-Molekülen ( $\text{PIP}_3$ ), die wiederum in die Signaltransduktion eingreifen. Auch der verringerte Abbau von  $\text{PIP}_3$ , vermittelt durch die Inhibition der Phosphatase SHIP1, spielt in der Aktivierung von nachfolgenden Signalwegen eine Rolle (52). Die PI3-Kinase ist zudem über  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren ( $i$ =inhibitory) wie LPA (lysophosphatic acid) in der Lage, Ras-unabhängig MAP-Kinasen zu aktivieren (53). Dabei scheint auch eine atypische Form der Proteinkinase C eine Rolle zu spielen. Der PI3-Kinase-Weg kann durch Wortmannin und LY294002 relativ spezifisch gehemmt werden.

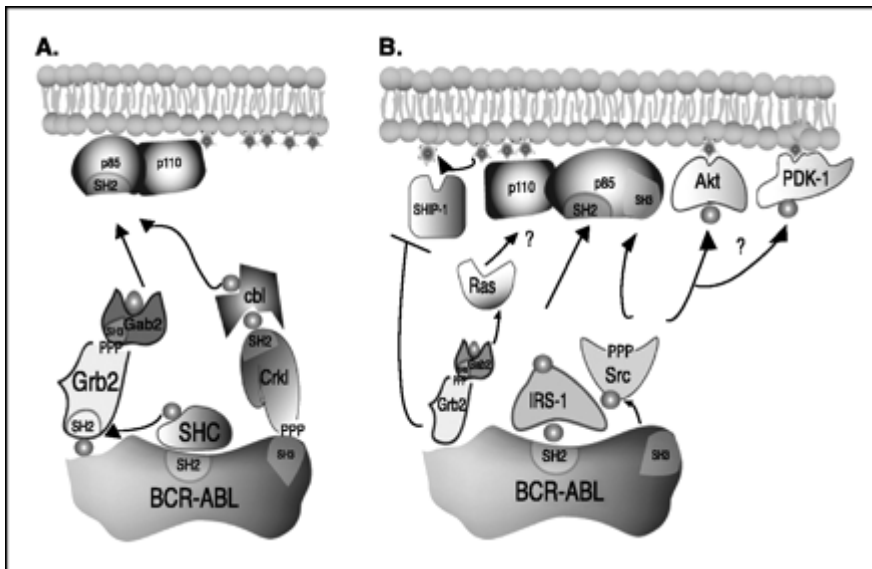


Abb. 8: Aktivierung des PI3-Kinase-Weges über BCR-ABL (52). A: Klassische Aktivierung der PI3-Kinase über den CRKL/CBL-Komplex. B: Weitere mögliche Mechanismen über Src, Ras und IRS-1 (Insulin receptor substrate-1).

### 2.4.3 Der S6-Kinase/mTOR-Signalweg

Die Serin-Threonin-Kinase mTOR (=mammalian target of rapamycin) phosphoryliert unterhalb von PI3K/AKT die S6-Kinase sowie 4E-BP1 (Eucaryotic initiation factor 4E-binding protein), worüber die Translation aktiviert wird (Abb. 9). mTOR kann auf zwei Wegen Insulin-abhängig (IGF-1) durch AKT aktiviert werden: mTOR kann direkt von AKT an zwei Aminosäuren phosphoryliert werden, diese Phosphorylierungsstellen liegen innerhalb einer Suppressor-Domäne, die die Aktivität der mTOR-Kinase negativ reguliert (54). Die Aktivierung von mTOR erfolgt jedoch hauptsächlich indirekt über TSC2 (tuberous sclerosis-2). TSC2 bildet in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren einen Komplex mit TSC1 und inhibiert so das kleine G-Protein Rheb (55). Aktiviertes AKT verhindert die Bildung des TSC-Komplexes, was zur Aktivierung von Rheb und somit auch zu mTOR führt (52). mTOR hat zwei Hauptsubstrate: Die p70S6-Kinase wird aktiviert, was zur Phosphorylierung des S6 ribosomal proteins führt. Darüber wird unter anderem das pro-apoptotisch wirkende BAD phosphoryliert und somit inaktiviert (56). Die Phosphorylierung von 4E-BP1 durch mTOR ermöglicht die Bindung von eIF4E an das 5'-Ende der mRNA und steigert so die Translation von Genen (57). Außerdem konnte Caspase-9 als AKT-Substrat identifiziert werden, deren Aktivität negativ reguliert und so zu verringerter Apoptose führt (58). Der S6-Kinase/mTOR-Weg reguliert somit Zellwachstum, -größe und -proliferation in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren/Nährstoffen und wurde in BCR-ABL-exprimierenden Zellen als konstitutiv aktiviert gefunden (59). Es konnte gezeigt werden, dass eine Imatinib-Therapie zu einer Aktivierung des PI3K/mTOR-Weges führt (60). Durch Rapamycin, welches mit FKBP12 einen Komplex bildet (61), kann mTOR spezifisch gehemmt werden. Dadurch kommt, bedingt durch verringerte Aktivität von p34<sup>cdc2</sup> und reduzierte Cyclin A, Cyclin D1 und c-Myc-Expression (62, 63), es zu einem G1-Arrest, die Zellproliferation wird inhibiert (64). Rapamycin wirkt synergistisch mit Imatinib, löst Apoptose in BCR-ABL-positiven Zelllinien aus (60) und ist in der Lage, die Imatinib-Resistenz zu überwinden, die durch BCR-ABL-Genamplifikation ausgelöst wird (59).



## 2.5 Therapie der chronischen myeloischen Leukämie

In der chronischen Phase wurde die CML bis vor einigen Jahren mittels konventioneller Chemotherapie (Busulfan, Hydroxyurea) behandelt. Leider erreichte dadurch nur ein Teil der Patienten eine hämatologische Remission, zytogenetisch waren die veränderten Zellen aber weiterhin nachweisbar, was fast immer zu einem Rezidiv führte. Bei der danach eingesetzten Therapie mit Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) konnte der Anteil der Patienten, die eine zytogenetische Remission erreichten, auf 20 % gesteigert werden, 80 % der Patienten überlebten länger als 5 Jahre (67). Die Entwicklung des BCR-ABL spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib 1992 sowie seiner Folgemedikamente stellt ein Meilenstein in der Therapie des CML dar. Chemisch gesehen handelt es sich bei Imatinib (Glivec, Gleevec, CPG57148) um ein 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]-phenyl]-Benzamid mit nachfolgender Strukturformel (Abb. 11).

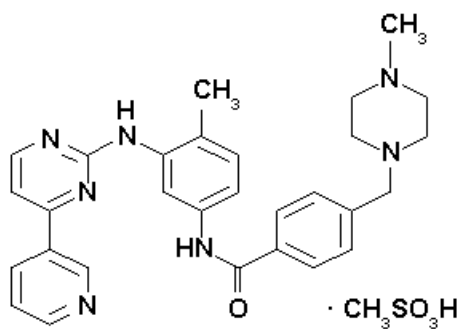


Abb. 11: Strukturformel von Imatinib-Mesylate ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Imatinib stellt einen kompetitiven Inhibitor für ATP dar, d.h. es bindet an das katalytische Zentrum der BCR-ABL-Kinase (Abb. 12) und verhindern so die Bindung von ATP (68;69). Dadurch wird die Phosphorylierung von Zielproteinen unterbrochen, der Proliferationsstimulus fällt weg. Imatinib hemmt in vitro die Substratphosphorylierung von ABL und BCR-ABL mit einer IC<sub>50</sub> von 0,025  $\mu$ M und die Autophosphorylierung von mit einer IC<sub>50</sub> von 0,25  $\mu$ M (70). Andere Kinasen werden von Imatinib nicht oder kaum gehemmt, mit Ausnahme von c-Kit (69) und PDGF (71). Imatinib verhindert die Zellproliferation (72), Koloniebildung (70) und löst Apoptose aus (73). Es beeinflusst jedoch nicht die Expression von BCR-ABL.

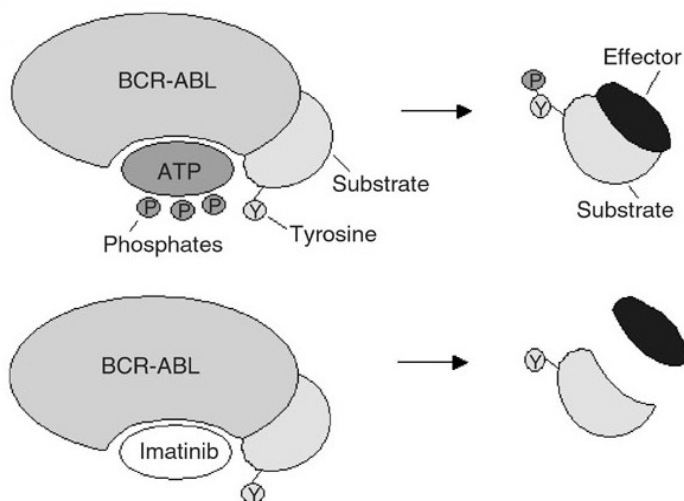


Abb. 12: Imatinib-Wirkung durch die kompetitive Bindung an die ATP-Bindestelle von BCR-ABL (74).

Imatinib wird in Europa seit Februar 2002 zur Therapie bei chronischer myeloischer Leukämie verwendet, jedoch zunächst nur bei Patienten, die auf konventionelle Therapiemethoden nicht angesprochen hatten oder sich in der Akzelerationsphase bzw. Blastenkrise befanden. Seit Dezember 2002 ist Imatinib auch in Deutschland zur Primärtherapie von Patienten mit neu diagnostizierter CML zugelassen. In mehreren Studien (75) konnte ein allgemein gutes Ansprechen auf Imatinib bei Patienten in der chronischen Phase beobachtet werden: 91 % der Patienten sprachen auf die Therapie an und erreichten eine komplette hämatologische Remission, d.h. im peripheren Blut waren keine Blasten mehr nachweisbar. 55 % dieser Patienten erreichten gute zytogenetische Remissionen, d. h. der Anteil an Blasten im Knochenmark betrug 0-35 % (76). Patienten in der Akzelerationsphase und in der Blastenkrise sprachen schlechter auf die Therapie mit Imatinib an: 69 bzw. 29 % erreichten eine hämatologische Remission, der Anteil der Patienten mit zytologischer Remission nahm stark ab (24 bzw. 16 %). Diese Zahlen verdeutlichen die Problematik der Resistenz gegenüber Imatinib. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass etwa 20 % der Patienten eine Resistenz gegenüber Imatinib zeigen. Mehr als 60 % dieser resistenten Patienten versterben im Verlauf der Erkrankung. Trotz einiger gut schon erforschter Mechanismen bleibt die Ursache der Resistenz bei über 35 % der Patienten ungeklärt (77). Als einzige wirkliche Heilungschance ist bis heute die Knochenmark- oder Stammzelltransplantation anzusehen.

## 2.6 Mechanismen der Imatinib-Resistenz bei CML

Bei den Resistenzen gegenüber Imatinib können zwei prinzipiell verschiedene Ausgangssituationen unterschieden werden: Bei der primären Resistenz kann durch Imatinib-Therapie kein hämatologischer oder zytogenetischer Effekt erzielt werden, bei der sekundären oder auch erworbenen Resistenz kommt es nach anfänglich gutem Ansprechen zu einem Rückfall.

Resistenzen können aufgrund von klinischen Kriterien in drei Gruppen eingeteilt werden:

- (1) Die hämatologische Resistenz ist durch die fehlende Normalisierung des Blutbildes und der Milzgröße gekennzeichnet.
- (2) Eine zytogenetische Resistenz liegt vor, wenn der Anteil der Philadelphia-positiven Zellen nicht unter 35 % reduziert werden kann.
- (3) Das molekulare Therapieansprechen wird über die Konzentration der BCR-ABL-mRNA definiert. Kann das BCR-ABL-Expressionsniveau nicht um mindestens 3 Logstufen oder auf 0,1 % im Vergleich zum Referenzgen reduziert werden, spricht man von einer molekularen Resistenz (78).

Häufig ist die Resistenz durch eine Veränderung an der BCR-ABL-Tyrosinkinase bedingt, die dazu führt, dass Imatinib nicht mehr wirken kann und somit die BCR-ABL-Kinase aktiv bleibt. Die Proliferation der Tumorzellen ist bei dieser Form der CML nach wie vor an die Aktivität der Tyrosinkinase gekoppelt und kann daher als BCR-ABL-abhängig bezeichnet werden. In einer Studie von Hochhaus et al. (79) konnte bei ca. 35 % der Patienten, die einen Rückfall erlitten hatten, eine Punktmutation in der ATP-Bindestelle nachgewiesen werden. Bei Patienten mit einer von Anfang an bestehenden, sogenannten primärer Resistenz wurden Mutationen in der ATP-Bindestelle jedoch nicht gefunden. Außerdem konnte in einer neuen Arbeit von Khorashad et. al (80) gezeigt werden, dass auch innerhalb der Patientengruppe mit einer Mutation in der ATP-Bindestelle ein variables Ansprechen auf Imatinib vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass weitere, bislang unbekannte BCR-ABL unabhängige Mechanismen die Imatinib-Resistenz modulieren können. Mutationen sind auch in anderen Bereichen der BCR-ABL-Tyrosinkinase beschrieben. So können Veränderungen in der

katalytischen Domäne oder in der Aktivierungsschleife zur dauerhaften Aktivität der Kinase führen (78). Auch die Überexpression von BCR-ABL spielt bei der Resistenzentwicklung potentiell eine Rolle. Eine steigende BCR-ABL-Proteinmenge führt dazu, dass nicht alle Moleküle durch Glivec blockiert werden können. Eine solche Überexpression konnte bei der Studie von Hochhaus (79) bei 7 von 55 untersuchten Patienten mit Hilfe von real-time PCR nachgewiesen werden. Sie zeigten eine mindestens 10fach gesteigerte Expression von BCR-ABL im Vergleich zu Patienten mit gutem Ansprechen. Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die verstärkte Ausschleusung bzw. verminderte Aufnahme von Imatinib und somit eine verringerte intrazelluläre Konzentration des Medikaments. Dabei spielen vor allem die Transporter Pgp, BCRP/ABCG2 und hOCT1 eine Rolle. Pgp und BCRP/ABDG2 sind Efflux-Pumpen und beschleunigen die Ausschleusung von Imatinib aus der Zelle. Letzter ist in vielen Tumoren überexprimiert und kommt auch in der CML-Stammzelle vor. hOCT1 vermittelt die Imatinib-Aufnahme in die Zelle und es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem guten Therapieansprechen ein signifikant höheres Expressionsniveau dieses Transporters zeigen als solche mit schlechtem Ansprechen (78).

Davon abzugrenzen ist die Form der Imatinib-Resistenz, die von der Funktionalität von BCR-ABL abgekoppelt ist. BCR-ABL scheint in solchen CML-Typen nicht bzw. nicht mehr zur Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps nötig zu sein. Die Unabhängigkeit von BCR-ABL ist höchstwahrscheinlich ein Effekt klonaler Selektion und beruht häufig auf der konstitutiven Aktivierung von Signalwegen unterhalb von BCR-ABL (78, 81). Damit in Einklang zu bringen ist die Tatsache, dass die Zahl der Patienten, die initial nicht auf Imatinib reagieren, im fortgeschrittenen Krankheitsstadium größer ist (77). In diesem Zusammenhang werden die bekannten zytogenetischen Sekundäraberrationen (+Ph, +8), die mit fortschreitender Erkrankung zunehmen (82) jetzt im Kontext der Imatinib-Resistenz diskutiert (83). Vor allem die Rolle der Trisomie 8 scheint interessant. Auf 8q24 ist das Protoonkogen c-myc lokalisiert. C-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der in proliferierenden Zellen auf niedrigem Niveau exprimiert und in engen Grenzen reguliert wird. Eine Fehlregulation mit dauerhaft hoher c-myc Expression ist oft mit der Entstehung und Progression von Tumoren assoziiert. Eine Trisomie 8 geht jedoch nicht immer mit einer Überexpression von c-myc einher (84). Ob ein zusätzliches Chromosom 8 mit der BCR-ABL-Unabhängigkeit korreliert, ist nicht nachgewiesen.

## **2.7 Die CML-Zelllinie KCL22, ein Zellkulturmodell der Imatinib-Resistenz**

Die verschiedenen Formen der Imatinib-Resistenz können mit Zellkulturmodellen, die aus Zelllinien mit unterschiedlichem Ansprechen auf Imatinib bestehen, untersucht werden. Die CML-Zelllinie KCL22, die 1981 von einer Patientin in der Blastenkrise etabliert wurde (Quelle DSMZ), ist initial resistent gegenüber Imatinib (85). Sie spricht wesentlich schlechter auf die Behandlung mit Imatinib an als alle anderen in der Arbeit von Mahon et. al (85) untersuchten Zelllinien. Die KCL22 besteht aus einem Gemisch sensibler und resistenter Klone, die voneinander isoliert werden konnten. Für die resistenten Klone ist eine BCR-ABL-Unabhängigkeit zu postulieren, da weder eine BCR-ABL-Überexpression noch eine Mutation in der ATP-Bindestelle nachgewiesen wurden und die Tyrosinkinaseaktivität in der sensiblen und der resistenten Zelllinie mit der gleichen Imatinib-Konzentration blockiert wird. Die IC<sub>50</sub>, die Konzentration, die nötig ist, um 50 % der BCR-ABL-Moleküle zu hemmen, ist bei beiden Zelllinien gleich. In einer Microarray-Analyse der cDNA von KCL22 S und KCL22 R wurden 39 Gene identifiziert, die zwischen den beiden Zelllinien

differentiell exprimiert sind (86). Davon waren 20 in der resistenten Zelllinie über- und 19 unterexprimiert. 13 der 39 Gene wurden durch die Behandlung mit Imatinib induziert oder reprimiert. Es konnte jedoch kein Gen identifiziert werden, welches direkt mit der Ursache des resistenten Phänotyps in Verbindung steht. In einer weiteren Microarray-Analyse von Ohmine et al. (87) wurde ebenfalls die Zelllinie KCL22 untersucht und durch kontinuierliche Imatinib-Behandlung eine resistente Zelllinie generiert und in einer Expressionsuntersuchung analysiert. Dabei wurde für die resistente Zelllinie eine deutlich erhöhte IC50 (11,6-fach) gegenüber der parental Zelllinie nachgewiesen. Damit ist die in dieser Arbeit generierte resistente KCL22-Zelllinie nicht unbedingt als repräsentativ für die Untersuchung einer initialen Resistenz anzusehen. In der Untersuchung wurden 46 Gene gefunden, die in der resistenten Zelllinie verstärkt exprimiert werden. Zwei davon konnten mit Real time PCR bestätigt werden, es handelte sich um die mit dem Ras-Signaltransduktionsweg assoziierten Gene RASAP1 und RhoA. An diese Ergebnisse anknüpfend wurde die Phosphorylierung der MAPK untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass diese Kinase in der Parentalzelllinie durch die Behandlung mit Imatinib blockiert werden kann, in dem resistenten Klon jedoch nicht. Inwieweit die Ergebnisse mit der Entstehung eines resistenten Phänotyps zusammenhängen, konnte jedoch auch in dieser Untersuchung nicht geklärt werden. In der Arbeit von Ferrari et al. (88) wurde die Imatinib-Resistenz auf proteomischer Ebene mittels 2DE anhand den Zelllinien LAMA84-S und -R analysiert. Es wurden 44 Proteine identifiziert, die zwischen sensibler und resistenter Zelllinie differentiell exprimiert waren. Es wurden unter anderem Heat Shock-Proteine und Ribonukleoproteine sowie Stoffwechselproteine gefunden, jedoch kein funktioneller Bezug zur Resistenz hergestellt.

### 3 Ziele der Arbeit

Resistenzen gegenüber Imatinib stellen bei der Therapie von chronischer myeloischen Leukämie immer häufiger ein Problem dar. Während erworbene Resistenzen gut verstanden sind und basierend auf den Erkenntnissen bereits neue Therapien entwickelt wurden, sind initiale Resistenzen in ihrer Ursache weitgehend ungeklärt. Patienten mit dieser Art von Resistenz haben eine schlechte Prognose. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Ursachen der primären Resistenz anhand des KCL22-Zellkulturmodells auf chromosomaler, molekulargenetischer und proteomischer Ebene zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Hauptziele der Arbeit sind dabei:

- Zytogenetische und molekularzytogenetische Charakterisierung der Zelllinien KCL22-S und -R
- Molekulargenetische Verifizierung chromosomaler Aberrationen mittels SNP-Analysen und quantitativer PCR
- Analyse und Identifizierung von differentiell exprimierten Proteinen sowie deren funktionelle Charakterisierung
- Untersuchung der BCR-ABL-assoziierten Signalwege (MAPK, PI3-Kinase, S6-Kinase) hinsichtlich ihrer Relevanz für die Imatinib-Resistenz der KCL22-R
- Analyse der Protein-Protein-Interaktionen relevanter Mitglieder der genannten Signalwege

Durch die Verwendung spezieller Inhibitoren kann die Relevanz der differentiell exprimierten oder phosphorylierten Proteine für die Resistenz untersucht werden. Wird dabei in einem Signalweg ein Unterschied zwischen sensibler und resistenter Zelllinie gefunden, ist es geplant, die Eigenschaften der Mitglieder dieses Signalweges mit verschiedenen molekularbiologischen Techniken genauer zu charakterisieren. Unter anderem kann durch den Einsatz von Kinase-Aktivitätstests die Regulation z. B. der Raf-Kinasen in An- und Abwesenheit vom Imatinib untersucht werden. Kann durch die Kombination von Inhibitoren mit Imatinib, z.B. CI-1040 als Inhibitor für Mek im MAPK-Signalweg die Imatinib-Resistenz überwunden werden, so stellt dies einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie von initial Imatinib-resistenten CML-Patienten dar.



## 4 Material

### 4.1 Arbeitsgeräte

- **Massenspektrometrie**

ProteinChip System, Series 4000

- **1D-Gelelektrophorese und Western Blot**

Mini Protean II und III, Biorad

Novex Mini-Gel, Invitrogen

H10, Harnischmacher

TransBlot, Biorad

Power Supply Model 1000/5000, Biorad

Electrophoresis Power Supply ST 606 T, GIBCO BRL

Power Supply Genofit Bio-50W

- **2D-Gelelektrophorese**

Multiphor II, Amersham Biosciences

Multitemp III, Amersham Biosciences

Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Amersham Biosciences

Immobiline Dry Strip Resolving Tray, Amersham Biosciences

- **Einzelzellkultivierung, Zellproliferationsanalysen und Apoptosemessung**

Schlitten für Pasteurpipetten und Spannungsquelle, Bachofer Laboratoriumsgeräte

Mikromanipulator Orbis microgen

CASY TTC, Schärfe System

Luminometer Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies

Spectramax Gemini, Molecular Devices

- **PCR und Sequenzierung**

Thermocycler PTC-200, MG Research

LightCycler, Roche

Agarose-Gel-Einheit HE 33, Hoefer

Elektrophorese-Power Supply, Gibco BRL ST 305

Geldokumentation Biodoc Analyze, Biometra

LI-COR DNA-Sequencer Model 4000 L

- **Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analyse**

Thermocycler PTC-200, MG-Research

Agarose-Gel-Einheit, HE 33, Hoefer

Elektrophorese-Power Supply, Gibco BRL ST 305

Geldokumentation Biodoc Analyze, Biometra

Vakuum Control Unit, Millipore

Hybridisierungssofen, Affymetrix

Scanner 3000 Affymetrix

**• Zentrifugen**

Microcentrifuge MC-13, Amicon Millipore  
Biofuge stratos, Heraeus  
Megafuge 1.0, Heraeus  
Mini spin plus, Eppendorf  
Rotina 35 R, Hettich  
Universal 30 RF, Hettich  
Speedvac DNA 120, Thermo Savant  
Force 7, Labnet

**• Schüttler**

Hybritech  
Thermomixer kompakt, Eppendorf  
Tritramax 101, Heidolph  
Unitwist RT  
Vibramax-VXR, IKA

**• Mikroskope**

Telaval 3, Carl Zeiss  
Axiovert, Carl Zeiss  
Axioplan 2 imaging HBO 100, Carl Zeiss  
Axioskop, Carl Zeiss

**• Heizblöcke, Brut- und Heizschränke**

Dri-Block DB3D, Techne  
Labortechnik BT 100, Kleinfeld  
Brutschrank 6000, Heraeus  
Function line, Heraeus  
Memmert

**• Sonstiges**

Biowave S2100 Diode Array Spectrophorometer, WPA  
Kühl- und Gefrierschränke, Liebherr, Scandiluxe und Heraeus  
Magnetrührer, IKA und Heidolph  
Mikrowelle, Bosch  
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, peqlab  
Pipetten, Gilson und Eppendorf  
Reax 2000 Vortexer, Heidolph  
Scanner, Amersham  
Sterilwerkbank Hera Safe, Heraeus  
Ultraschallbad Sonorex RK31, Bandelin  
Vortexer, AdW ZIMET  
Waagen, Sartorius  
Wasserbad, GFL  
WTW pH-Meter pH 538  
Zählkammer, Neubauer improved

## 4.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### • Medium und Inhibitoren

RPMI, Pan Biotech  
 Methocult GF<sup>+</sup> H4435, StemCell Technologies  
 Fetales Kälberserum (FCS), Biochrom  
 Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Roth  
 Imatinib, Novartis  
 CI-1040, Pfizer  
 Rapamycin, LC Laboratories  
 Wortmannin, Upstate  
 LY-294002, Cell Signalling  
 Geldanamycin, LC Laboratories

### • Zellproliferationsanalysen und Apoptose

CASY-Ton, Schärfe System  
 ATP-Lite, Luminescence Assay System, Perkin Elmer  
 Apo-ONE<sup>TM</sup> Homogeneous Caspase 3/7 Assay, Promega

### • primäre Antikörper

**Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper:**

Detektiertes Antigen	Bezeichnung des Herstellers	Größe des Antigens	Spezifität	Hersteller
27 kDa Heat Shock protein	Hsp27	27 kDa	Kaninchen, polyklonal	Acris
70 kDa Heat Shock protein	Hsp70 (sc-59569)	70 kDa	Maus, monoklonal	Santa Cruz
90 kDa Heat Shock protein	Hsp90 (610418)	90 kDa	Maus, monoklonal	BD Biosciences
ABL	c-Abl (24-11), sc-23	145/210 kDa	Maus, monoklonal	Santa Cruz
AKT	PanAKT (9272)	60 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Aktin	A-2066	42 kDa	Kaninchen, polyklonal	Sigma
B-Raf	C-19, sc-166	95/62 kDa	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
C-Raf	C-Raf (610152)	74 kDa	Maus, monoklonal	BD Biosciences
Enolase	sc-51880	48 kDa	Maus, monoklonal	Santa Cruz
Erk	pan ERK (610123)	42-85 kDa	Maus, monoklonal	BD Biosciences
Mek	Mek 1 (610235)	46 kDa	Maus, monoklonal	BD Biosciences
Nucleophosmin	B23 (H-106), Sc-5564	38 kDa	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Phospho-AKT	Ser (473) (9271)	60 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Phospho-B-Raf	Phospho-B-Raf (Ser445) (2696)	95 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Phospho-c-Abl	Tyr412 (2865)	135/230 kDa	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
Phospho-C-Raf	Phospho-Raf (Ser259) (9421)	74 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Phospho-Erk	Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/204) (9101)	42/44 kDa	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
Phospho-Mek	Phospho-Mek1/2 (ser217/221) (9154)	45 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling

Detektiertes Antigen	Bezeichnung des Herstellers	Größe des Antigens	Spezifität	Hersteller
Phospho-p70 S6-Kinase	Thr389 (108D2)	70/85 kDa	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling
p-Tyr	p-Tyr, sc-7020	Tyrosinreste	Maus, monoklonal	Santa Cruz
Ras	Anti-Pan-Ras (Ab-4)	21 kDa	Maus, monoklonal	Calbiochem
Retinoblastoma Protein	Rb, sc-102	106 kDa	Maus, monoklonal	Santa Cruz
p70-S6-Kinase	9202	70/85 kDa	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling
Vimentin	V9, sc-6260	54 kDa	Maus, monoklonal	Santa Cruz

### • sekundäre Antikörper und Kontroll-Antikörper

Anti-Rabbit-AP, Santa Cruz  
 Anti-Mouse-AP, Santa Cruz  
 Anti-Rabbit-HRP, Santa Cruz  
 Anti-Mouse-HRP, Santa Cruz  
 Anti-Sheep-AP, Sigma  
 Goat-Anti-Mouse IgG (H+L) HAS, Medac  
 normal-Mouse-IgG, Peprotech, 250 µg/ml  
 normal-Rabbit-IgG, Peprotech, 250 µg/ml

### • Massenspektrometrie

SELDI-Chips, verschiedene Oberflächen (IMAC, NP-20, Q-10, CM-10, Au)  
 Energie-absorbierende Matrix (SPA, CHCA)

### • 1D-Gelelektrophorese

Precast Bis-Tris-Gele, verschiedene PAA-Konzentrationen, Invitrogen  
 Polyacrylamid, 37,5 %, Serva  
 Page Ruler Protein-Marker (gefärbt und ungefärbt), Fermentas  
 Protein Marker Mark12 (ungefärbt), Invitrogen  
 Protein Marker Bench Mark (gefärbt), Invitrogen

### • 2D-Gelelektrophorese

Immobiline Dry Strips, verschiedene pI-Bereiche, GE Healthcare  
 Precast Gele, 4-12 % Bis-Tris ZOOM, 1,0 mm X IPG well, Invitrogen  
 Iodacetamid (IAA), Sigma  
 Dithiothreitol (DTT), Sigma  
 PlusOne Dry Strip Cover Fluid, Amersham Biosciences

### • Western Blot

Transblot PVDF-Membran, Biorad  
 Filterpapier, Machery Nagel  
 Tween-20, Sigma  
 Milchpulver fettarm, Tegut  
 BCIP, Roth  
 NBT, Roth  
 Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma  
 ECL: Westernlightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer Life Science

### • Immunpräzipitation und Kinase-Assay

Protein-G-Sepharose, Sigma  
 Sepharose CL-4B  
 µMACS Protein MicroBeads, MACS molecular  
 L-Glutathion, Sigma  
 Glutathion-Sepharose™ 4B, Amersham  
 Dialyseschläuche, Spectra/Por 6-8000, Roth  
 [ $\gamma$ 35-P]-ATP, Hartmann Analytik  
 Myelin Basic Protein (MBP), Sigma

### • Klonierung

TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen  
 Gene Jet PCR Cloning Kit, Fermentas  
 DNA-Extraction Kit, Fermentas

**Tabelle 2: Verwendete Vektoren und Bakterienstämme**

Vektor-Name	Inseriertes Gen/ Vektor	Selektion
TOPO	BCR-ABL	Ampicillin
PJET1/ blunt Cloning Vector	B-Raf/ C-Raf	Ampicillin
pDEX-GST-RBD	Ras-Binde-Domäne	
	GST-Mek	
	GST-Erk-His	
<b>Bakterienstämme</b>		
HB101		
BL21		
BL-21/DE3/pLys		

### • RNA-Isolation, cDNA-Synthese, PCR und Agarose-Gelelektrophorese

TriReagent, Sigma  
 Superscript II™ Reverse Transkriptase, Invitrogen  
 Quantitect SYBR Green, Qiagen  
 HotMaster Tag DNA-Polymerase, Eppendorf  
 dNTPs, Perkin Elmer  
 Sea Kem Agarose, Biozym

### • Sequenzierung

Sequi Therm Exel II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Technologies)  
 Sequa Gel XR und Sequa Gel complete, national diagnostics

### • SNP-Analysen

DNA-Isolationskit Mini, Qiagen  
 Restriktionsenzyme Xba I mit entsprechenden Puffern, NEB  
 Ligationskit T4-Ligase, NEB  
 PCR-Kit, Invitrogen  
 GeneChip Human Mapping 50K Assay-Kit, Affymetrix

**• allgemeine Chemikalien**

Acetonitril (ACN), Sigma	Kupfer-Sulfat, Sigma
Aluminiumsulfat, Roth	LB-Agar, Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS), Sigma	Leupeptin, Serva
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin), Roth	Magnesiumacetat, Sigma
Benzamidin, Sigma	Magnesiumchlorid, Merck
Beta-Mercaptoethanol, Sigma	Manganchlorid, Roth
Beta-Glycerophosphat, Sigma	MES, Roth
Borsäure, Roth	Methanol, Roth
Brij, Applichem	Microcystein, Axxora
Bromphenolblau, Sigma	MOPS, Roth
Calciumchlorid, Sigma	Natriumacetat, Sigma
Chloroform, Merck	Natriumchlorid, Roth
Coomassie, G250, Serva	Natriumfluorid, Sigma
Dimethylformamid, Sigma	Natriumhydrogenphosphat, Merck
Dithiothreitol (DTT), Sigma	Natrium-Vanadat, Sigma
EDTA, Sigma	Pepton aus Fleisch, Merck
EGTA, Roth	Phosphorsäure, Roth
Ethanol, Merck	PIPES, Roth
Ficoll, Sigma	PMSF, Roth
Glycerin, Sigma	Sodiumdodecylsulfat (SDS), Roth
Glycin, Roth	Sucrose, Roth
Hefeextrakt, Merck	Temed, Sigma
IPTG, Appligene	Trifluoressigsäure (TFA), Sigma
Isopropanol, Roth	Tris, Roth
Kaliumchlorid, Roth	Trypanblau, Roth
Kaliumhydrogenphosphat, Roth	Trypsin Gold, Promega

**• sonstige Verbrauchsmaterialien**

Zellkulturflaschen für Suspensionskulturen, verschiedene Größen, Greiner  
6-, 12-, 24- und 96-well-Kulturplatten, Greiner  
96-well-Platten, schwarz bzw. weiß mit durchsichtigem Boden, Greiner  
sterile Einmalpipetten, 5 und 20 ml, Greiner  
Spitzröhrchen, 15 und 50 ml, Greiner  
Reaktionsgefäße, verschiedene Ausführungen, Eppendorf und Biozym  
Kryoröhrchen, Greiner  
Pipettenspitzen, verschiedene Ausführungen, Gilson, Greiner, Biozym  
Pipettenspitzen für Sequenzierung, Costar  
Glaspipetten, Brand und Assistant  
CASY-Röhrchen (CASYcups), Schärfe System  
LightCycler Glaskapillaren, Roche  
Sterilfilter Minisart, Porenweite: 0,2  $\mu$ M, Sartorius  
Cl-X Posure Film, Clear Blue X-Ray Film, Pierce

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Zelllinien und Inhibitoren

Die Untersuchungen wurden anhand des KCL22-Modellsystems durchgeführt. Es wurden je zwei sensitive (KCL22-S1 und S2) und zwei resistente Subklone (KCL22-R1 und R2) sowie die Parentalzelllinie KCL-22 untersucht. Für nähere Details s. 2.7. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit RPMI-Medium + 10 % FCS kultiviert. Sie wurden zweimal wöchentlich bei einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml passagiert. Die resistenten Subklone wachsen permanent in Anwesenheit von 1 µM Imatinib. Für die Analyse des Resistenzmechanismus wurden verschiedene Signalwege mit Inhibitoren untersucht.

- Imatinib (Novartis), 10 mM in DMSO, Arbeitslösung 100 µM in PBS, steril filtriert, Endkonzentration 1-10 µM
- CI-1040 (Pfizer), 10 mM in DMSO, Endkonzentration 0,1-0,5 µM
- Wortmannin (upstate), 10 mM in DMSO, Endkonzentration 100 nM
- LY294002 (cell signaling), 10 mM in DMSO, Endkonzentration 5-20 µM
- Rapamycin (LC Laboratories), 100 µM in DMSO, Endkonzentration 0,05-20 nM
- Geldanamycin (LC Laboratories), 1 mM in DMSO, Endkonzentration 2,5-50 nM

Die detaillierten Versuchsanordnungen mit Zellkonzentrationen, Volumina, Anzahl der biologischen Replikate, Behandlungsdauer sowie genauer Inhibitorkonzentrationen finden sich im Ergebnisteil.

#### 5.1.2 Zellproliferationsanalysen und Apoptosemessung

Für die Zellproliferationsanalysen wurde zunächst die Zellkonzentration mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden aus der Zellsuspension 20 µl entnommen und mit 20 µl 0,5%iger Trypanblau-Färbelösung versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 8 µl des Gemischs auf die Zählkammer aufgetragen und zwei diagonal gegenüberliegende Großquadrate ausgezählt. Die Zellsuspension wurde nun zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT) und mit frischem Medium auf die entsprechende Zellzahl eingestellt. Für die Zellproliferationsanalysen wurde eine Startzellzahl von  $0,2-1,0 \times 10^6$  Zellen/ml gewählt. Die Analysen erfolgten in 12-Well-Platten in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung. Die Proliferation wurde in Kooperation mit der AG Hipler, Klinik für Dermatologie der FSU Jena mittels automatischer Zellzählung (CASY) und ATP-Messung untersucht. Dazu wurde täglich 1 ml Zellsuspension aus dem Versuchsansatz entnommen und in Reaktionsgefäße überführt.

Für die CASY-Analysen wurden 50 µl Zellsuspension in 10 ml CASY-Ton-Puffer verdünnt. Um die Menge an lebenden Zellen zu ermitteln, wurde die Zellzahl in einem Größenbereich von 9,99 - 24,99 µm Zelldurchmesser ermittelt. Außerdem wurde die Gesamtzellzahl in einem Größenbereich von 7,50 - 24,99 µm bestimmt. Der Anteil an toten Zellen ergibt sich aus der Differenz der beiden Werte.

Die ATP-Messung wurde mit Hilfe des ATPlite Luminescence Assay System (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben modifiziert nach (89) durchgeführt. Das System basiert auf der luminometrischen Bestimmung des ATP-Gehalts in der Probe, der mit der Menge an lebenden Zellen korreliert.

3x100 µl Zellsuspension jeder Probe wurden in 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden pipettiert und mit je 50 µl Lysepuffer versetzt. Die Lyse erfolgte im Dunkeln bei RT für 5 min bei 700 rpm auf dem Schüttler. Nach Zugabe von 50 µl Substrat erfolgte zunächst eine Inkubation im Dunkeln bei RT für 5 min bei 700 rpm auf dem Schüttler und anschließend für 10 min im Luminometer (Lumistar Galaxy, BMG Labtechnologies). Für die Lumineszenz-Messung wurde das Cyto-Packard-Programm verwendet. Dafür wurde jedes Well fünffach ausgelesen. Um die gemessenen Lumineszenzwerte einer ATP-Konzentration zuordnen zu können, wurde ein Standard sowie ein Mediums-Blindwert in Doppelbestimmung mitgeführt. Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Zellkonzentrationen durchgeführt, um die ATP-Menge pro Zelle zu ermitteln.

Für die Apoptose-Messung wurde das APO-One Homogeneous Caspase 3/7-Assay (Promega) verwendet. Dazu wurden 100-500 µl Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, RT) und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 3x20 µl zu je 20 µl Assay gegeben und ca. 2 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Quantifizierung der Caspase-Aktivität erfolgte bei nach Anregung bei 499 nm und Messung der Emission bei 521 nm mithilfe des Spectramax Gemini, Molecular Devices.

### 5.1.3 Einzelzellkultivierung

Die Isolation der Einzelzellklone erfolgte in modifizierter Form wie in Hohmann et al. (90) beschrieben. Für die Separierung der Klone mit spezifischen chromosomalen Abberationen aus der resistenten Zelllinie wurde semisoliden Medium verwendet. Methocult GF<sup>+</sup> H4435 (StemCell Technologies) eignet sich lt. Hersteller besonders für Kultivierung von myeloiden Vorläuferzellen. Das semisoliden Medium ist bei 4 °C flüssig und wurde zu je 3 ml aliquotiert. Für die Aussaat wurden 1x10<sup>4</sup> bzw. 1x10<sup>5</sup> Zellen der resistenten Zelllinie je ml Medium zugegeben, sanft gemischt und auf zwei kleine Petrischalen verteilt. Ein Ansatz wurde in Anwesenheit von 1 µM Imatinib durchgeführt, um auf die Klone mit einer Disomie für 13q14 zu selektionieren. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ca. eine Woche kultiviert. Aus den Schalen mit einer Zellkonzentration von 1x10<sup>4</sup> Zellen/ml wurden je 15-20 Klone mit speziell ausgezogenen Glaskapillaren abgesaugt und in 96-Well-Platten (RPMI + 10 % FCS) überführt und anschließend je nach Wachstum in größere Kulturflaschen überführt. Die gewachsenen Klone wurden mittels Interphase-FISH auf ihre Zusammensetzung überprüft (s. 5.2.2).

## 5.2 Zytogenetische Methoden

### 5.2.1 Chromosomenpräparation und GTG-Bänderung

Für die Chromosomenpräparation wurden die Zellen in den Kulturflaschen zunächst 90 min mit Colcemid bei 37 °C inkubiert, um den Zellzyklus in der Metaphase zu arretieren. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) wurden die Zellen mit 10 ml hypotoner Lösung (0,559 g KCl/100 ml Wasser) resuspendiert und für 20 min inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Fixativ (Methanol:Eisessig 3:1) zugegeben, gemischt und zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei- bis dreimal mit je 10 ml Fixativ gewaschen, anschließend in 1 ml Fixativ resuspendiert und die so präparierten Kerne auf Objektträger (OT) getropft. Die Präparate wurden über Nacht bei 70 °C gealtert. Für die GTG-Bänderung (Giemsa-Färbung) wurden die OT zunächst kurz in Trypsin (0,06 % in PBS) getaucht, um die Proteinhülle der Chromosomen anzudauen. Die OT wurden zweimal in PBS-Puffer gewaschen, 4-6 min in Giemsa-Färbelösung (5 %ig) gefärbt und anschließend unter



Leitungswasser abgespült. Nach Luft-Trocknung erfolgte die Auswertung Computergestützt mittels Mikroskop und der Ikaros-Software (Metasystems).

### 5.2.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Um Teile oder ganze Chromosomen sequenzspezifisch zu markieren, wurde die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung-Technik (FISH) verwendet. Damit ist es möglich, Chromosomen sowohl in der Metaphase als auch in Interphasekernen zu analysieren (91). Die wie unter 5.2.1 beschrieben vorbereiteten Proben wurden auf Objektträger aufgetropft. Anschließend wurden die Chromosomen und Kerne mit Pepsinlösung angedaut und danach mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen (10 min, 100 µl Postfix) und erneutem Waschen in PBS wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Vor der Hybridisierung wurden sowohl Sonde als auch Objektträger denaturiert. Dafür wurde der OT mit 70%igem Formamid und Erhitzen auf 70 °C behandelt und die Sonde im Thermocycler bei 75 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde die Sonde auf den nochmals dehydrierten OT gegeben, die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht. Die überschüssige Sonde wurde abgewaschen (Waschpuffer 1-3), die Objektträger dehydriert und nach Trocknen mit DAPI (1,5 µl DAPI-Stocklösung in 1 ml Vectashield) gegengefärbt. Die so markierten Zellen wurden mittels Mikroskop, Counter AC-12 und ISIS-Software (Metasystems) ausgewertet.

<b>Postfix-Lösung</b>	<b>Waschpuffer 1</b>	<b>Waschpuffer 2</b>	<b>Waschpuffer 3</b>
5 ml Paraformaldehyd-Lsg. 2 %-ig	0,4-2x SSC	4x SSC/Tween	1x PBS
4,5 ml 1x PBS		(0,25 %)	
500 µl 1 M MgCl <sub>2</sub>			

#### verwendete Sonden für Interphase-FISH:

Chromosom 6: Cep 6 (Centromer), Spektrum Green (SG), Abbott

Chromosom 8: Cep 8 (Centromer), Spektrum Green (SG), Abbott

Chromosom 13: LSI 13S319 (lokus-spezifisch), Spektrum Orange (SO), Abbott

#### Verwendete Sonden für 24-Farben-FISH:

Bei der 24-Farben-FISH wurde, wie in der Arbeit von Küchler et al. (92) beschrieben, durch die Verwendung von Ganzchromosomen-Sonden und Falschfarbenanalyse jedes Chromosom in einer anderen Farbe dargestellt. Es ist daher möglich, in einem einzigen Experiment detaillierte Informationen über die chromosomalen Veränderungen in einer Zelle zu erhalten, ohne ein Bänderungsverfahren durchführen zu müssen. Vor allem Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen können so gut nachgewiesen werden. Die Sonden wurden im Institut für Humangenetik, Jena hergestellt. Die 24-Farben-Analyse der Zelllinien sowie auch das Multicolor-Banding wurden von Dr. Anja Weise, AG Zytogenetik durchgeführt.

### 5.2.3 Multicolor-Banding

Multicolor-Banding (MCB) ist eine molekular-zytogenetische Methode zur detaillierten Analyse von chromosomalen Abberationen. Sie wurde im Institut für Humangenetik, Jena, etabliert und ist ausführlich in der Arbeit von Chudoba et al. und Liehr et al. (93;94) beschrieben. Kurz zusammengefasst, wurden für alle Chromosomen überlappende Mikrodissektionsbanken erstellt und mit Hilfe der DOP-PCR vermehrt und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bzw.

Avidin/Dioxygenin markiert. Diese Sonden wurden anschließend auf die zu untersuchenden Metaphaseplatten hybridisiert und detektiert. Es ergibt sich für jedes Chromosom ein spezifisches Bandenmuster. So können auch kleinere Veränderungen nachgewiesen werden (bis 2 MB, abhängig von der Größe der Chromosomen).

### 5.3 Molekulargenetische Methoden

#### 5.3.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren pelletiert und das überstehende Kulturmedium verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TriReagent lysiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und Zentrifugation bei  $12000 \times g$  und  $4^\circ C$  erfolgte eine Auftrennung in drei Schichten. Die aquatische Phase wurde entnommen und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, um die RNA auszufällen. Die RNA wurde durch Zentrifugieren bei  $12000 \times g$  und  $4^\circ C$  pelletiert und mit 75 %igem Alkohol gewaschen. Der Alkohol wurde verdampft und das Pellet in Wasser gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser bestimmt.

Dabei gilt für RNA:  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$ .

Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times 40 \text{ (RNA-spezifischer Faktor)} \times 24 \text{ (Verdünnungsfaktor)} = \text{Konz. RNA } \mu\text{g/ml}$$

Um die Reinheit zu ermitteln, wurde der Quotient zwischen  $\text{OD}_{260}$  und  $\text{OD}_{280}$  gebildet. Dabei sollte das Verhältnis je nach RNA-Isolationsmethode zwischen 1,7 und 2,0 liegen, um eine Verunreinigung mit Proteinen, die nachfolgende Arbeitsschritte, z.B. die cDNA-Synthese, inhibieren könnten, auszuschließen.

#### 5.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase-Systems der Firma Invitrogen durchgeführt. Um 20  $\mu\text{l}$  cDNA zu erhalten, wurden 4  $\mu\text{l}$  *random* Hexamere und Oligo-dT-Primer zu 8  $\mu\text{l}$  totaler RNA (2  $\mu\text{g}$ ) gegeben und 15 min bei  $70^\circ C$  im Thermocycler erhitzt. Dabei wird die mit sich selbst hybridisierte RNA denaturiert. Die Denaturierung wurde durch die Überführung der Reaktionsgefäße in Eis gestoppt. Nach Zugabe von 7  $\mu\text{l}$  Mastermix, bestehend aus 4  $\mu\text{l}$  5x First Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT und 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP Mix, wurde der Ansatz 10 min bei  $25^\circ C$  inkubiert. Dabei binden die Primer an die RNA. Nach 2 min bei  $42^\circ C$  wurde 1  $\mu\text{l}$  der Reversen Transkriptase zugegeben und gemischt, anschließend wurde der Ansatz 53 min bei  $42^\circ C$  inkubiert, die Amplifikation erfolgte. Die anschließende Denaturierung erfolgte bei  $70^\circ C$ .

#### 5.3.3 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit Hilfe des Quantitect SYBR-Green Kit, Qiagen, und des LightCyclers, Roche, durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green lagert sich während des PCR-Verlaufs unspezifisch an die doppelsträngige DNA an. Die Quantifizierung erfolgt nach Anregung mit einem Laser bei 470 nm und Messung der Emission bei 522 nm. Für die Quantifizierung sind die *Crossing Points* oder auch *Cycle Thresholds* ( $C_t$ -Werte) entscheidend. Der *Crossing Point* stellt den PCR-Zyklus dar, bei der die Fluoreszenzintensität logarithmisch ansteigt. Die  $C_t$ -Werte für Target- und Referenz-Gen werden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Methode

nennt man eine relative Quantifizierung. Die zu untersuchenden Proben befinden sich aufgrund der baulichen Besonderheiten des LightCyclers in Glaskapillaren, dadurch ist das Gesamtreaktionsvolumen der PCR (10 µl) geringer als in üblichen Reaktionsgefäßen.

#### Zusammensetzung eines Ansatzes:

5 µl SYBR-Green Master-Mix (enthält SYBR-Green, Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>)

3,5 µl RNase-freies Wasser

0,5 µl Primer, *forward*

0,5 µl Primer, *reverse*

0,5 µl cDNA

Die Analysen erfolgten anhand von Dreifachbestimmung, die Auswertung erfolgte mit MS Excel nach der Delta-Delta-Ct-Methode. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Oligo-Software ermittelt und PCR-Bedingungen so gewählt, dass für alle untersuchten Gene eine ähnliche PCR-Effizienz erreicht werden konnte, welche mithilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt wurde. Daher konnten alle Werte anhand folgender Formel berechnet werden, wobei für E (Effizienz) ein Wert von 2 angenommen wurde:

$$r(\text{Ratio}) = \frac{E_{\text{target}}^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

Als Referenzgen wurde Beta-Aktin bzw. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die quantitative PCR** (in Klammern Literaturquelle für Primersequenzen und PCR-Bedingungen, sofern nicht selbst etabliert)

Genname	Primernamen	Sequenz 5'-3'	Annealing-Temp.	Produktgröße
AKT	AKT 1 up AKT 1 low	GCT GGA CAA GGA CGG GCA CAT GCA GGC GAC CGC ACA TCA TCT	58 °C	200 bp
Aktin	b-Aktin forward b-Aktin reverse	ACA GAG CCT CGC CTT TGC CGA CAC GAT GGA GGG GAA GAC G	58 °C	160 bp
BCR-ABL	BCR b2 ABL a2	CAT TCC GCT GAC CAT CAA TAA G CAA CGA GCG GCT TCA CTC A	60 °C	90/ 165 bp
B-Raf (95)	braf up braf low	GAG ATT CCT GAT GGG CAG AT GCC ACT TTC CCT TGT AGA C	58 °C	76 bp
C-Raf	CRAF up 1 CRAF low 1	GCG GGA GTA AGA GGA AAA CGA CGG AGG CGG TCA CAT TC	58 °C	190 bp
G6PDH	G6PDH 3 G6PDH 4	AAA CAG AGT GAG CCC TTC TTC GCG GTT CCA GCC TAT CT	58 °C	255 bp
MAPK	MAPK 1 up 1 MAPK 1 low 1	GCC CCG ACA TCT CAG GTT G GTG GGT CTG TTT TCC GAG GAT	58 °C	203 bp
RAB7B	RAB7B 3 up RAB7B 3 low	CGT CGG AGC CAT TGG TGT G GCC ATC GGA GCC CTT GTA GAA	58 °C	211 bp
S6Kinase	S6K 1 up S6K 1 low	AGG CGG GAC GGC TTT TAC TTC TGG CCC TCT GTT CAC AC	58 °C	237 bp

#### 5.3.4 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte modifiziert nach Inoue et al. (96). Kurz zusammengefasst, wurden die Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,07-0,1 bei 18 °C kultiviert, geerntet und in eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis, Zentrifugation und erneuter Inkubation für 5 min wurde das Pellet in TB-Puffer mit DMSO resuspendiert, aliquotiert, schockgefroren und die Aliquots bei -80 gelagert.

Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Gene Jet PCR Cloning Kit. Dafür wurden 4 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 10 µl Reaktionspuffer, 3 µl Wasser und 1 µl Blunting Enzym für 5 min bei 70 °C inkubiert, um die Überhänge am PCR-Produkt zu entfernen. Anschließend wurden 1 µl pJET1 blunt Cloning Vektor und 1 µl T4-Ligase zugeben und der Ansatz für 5 min bei RT ligiert. Fünf µl dieses Ligationsansatzes wurden zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben und 30 min auf Eis, dann 2 min bei 37 °C und anschließend wieder 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl frischem Medium resuspendiert und dann die so transformierten Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die gewachsenen Klone wurden in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und die Plasmide per MiniPrep isoliert.

**TB-Puffer**

10 mM PIPES

15 mM CaCl<sub>2</sub>

250 mM KCl

55 mM MnCl<sub>2</sub>**LB-Agar:** 12,8 g LB-Agar auf 400 ml Wasser**LB-Medium:** 4 g NaCl, 2 g Hefeextrakt, 4 g Pepton aus Fleisch auf 400 ml Wasser**Antibiotika:** Kanamycin 50 mg/ml, Sollendkonzentration 10 µg/ml

Ampicillin 50 mg/ml, Sollendkonzentration 50 µg/ml

Um das Ergebnis der Klonierung zu überprüfen, kann das Insert mit Hilfe der Sequenzierung analysiert werden. Dabei wurde die Methode von Sanger (97) verwendet, die auf der enzymatischen Neusynthese eines markierten, komplementären DNA-Einzelstrangs, die basenspezifisch unterbrochen wird, basiert. Für die Sequenzierung der ATP-Bindestelle von BCR-ABL wurde das TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) sowie die M13-Sequenzierprimer verwendet. Die Sequenzen von B-Raf und C-Raf wurden mit dem Gene Jet Cloning Kit (Fermentas) und den pJET-Sequenzierprimern untersucht. Für die Sequenzierung wurde der Sequi Therm Exel II DNA Sequencing Kit-LC der Firma EPICENTRE Technologies nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzierungsprimer wurden IRD-markiert (Infrared Dye), um die entstehenden DNA-Fragmente im Sequenzier-Gel sichtbar zu machen. Der Mastermix enthielt je zu untersuchender Probe 3,9 µl Template (PCR-Produkt), 3,9 µl deionisiertes Wasser, 1 µl M13 reverse-Primer (10 mM), 7,2 µl Sequenzier-Puffer und 1 µl Polymerase. In jedem dNTP-Mix befand sich ein Anteil Didesoxytriphosphat (ddNTP). ddNTPs unterscheiden sich von normalen dNTPs dadurch, dass ihnen eine OH-Gruppe fehlt. Deshalb können an diese keine weiteren Nukleotide angelagert werden, was einen Kettenabbruch zur Folge hat. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die, je nach Ansatz, mit der Base A, C, G oder T enden. Im Anschluss wurde die PCR durch eine Stopplösung beendet, die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. Dazu wurde ein 6%iges, 41 cm großes Polyacrylamid-Gel gegossen, welches nach Polymerisierung und Aufheizen auf 50 °C mit je 0,4 bzw. 0,8 µl Probe beschickt wurde. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der Software Image Manipulation, LI-COR und mit Hilfe verschiedener Internetseiten (u.a. (<http://www.cse.ucsc.edu/~kent/fuzzyFind/fuzzyFind.html>, <http://expasy.org/tools/dna.html>).

**Zusammensetzung Sequenzier-Gel**

30 ml Sequa Gel XR  
 7,5 ml Sequa Gel complete  
 300 µl 10 % APS

**10x TBE long run**

1,34 M Tris  
 45 mM Borsäure  
 25 mM EDTA

**Tabelle 4: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die Sequenzierung** (in Klammern: Literaturquelle für Primer und PCR-Bedingungen)

Genname	Primernamen	Sequenz 5'-3'	Annealing	Produkt
ABL (98)	NTPB+ NTPE-	AAG CGC AAC AAG CCC ACT GTC TAT CTT CGT CTG AGA TAC TGG ATT CCT	58 °C	856 bp
B-Raf Exon 11 (99)	BRAF 11 up BRAF 11 low	AGC TCC CAA TGT GCA TAT AAA GGA ATA GCC CAT GAA GAG TAG	55 °C	621 bp
B-Raf Exon 15 (99)	BRAF 15 up BRAF 15 low	GTG AGG GCT CCA GCT TGT ATC AC AAA CCA GCC CGA TTC AAG GAG GG	55 °C	466 bp
C-Raf (99)	RAF1 9-10cF RAF1 14cR	CAA AAT TAG GCC TCG TGG ACA GA TCC AGA GGA CAG AGC CAG TAG G	58 °C	551 bp
-	M13 forward	IRD-800-CTG GCC GTC GTT TTA C	50 °C	-
-	M13 reverse	IRD-800-CAG GAA ACA GCT ATG AC	50 °C	-
-	pJET Seq. forw	IRD-800-GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC	50 °C	-
-	pJET Seq. rev	IRD-800-GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C	50 °C	-

**5.3.5 SNP-Analysen**

Für die Analyse chromosomaler Imbalancen der verschiedenen Klone der resistenten Zelllinie mittels Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Analysen wurde DNA aus einem Zellpellet (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen) mit Hilfe des QiaAMP DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Qualität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, um den Grad der Degradation zu bestimmen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (Nanodrop, PeqLab) bestimmt. Für den enzymatischen Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym XbaI wurden 250 ng DNA eingesetzt. An die 200-2000bp langen DNA-Fragmente wurde mittels T4-Ligase ein Adapter (3' AAT ACT CGT GCT GTC TGC GGA CTA GAG ATC T 5') ligiert, anschließend erfolgte eine Amplifikation der Fragmente mittels PCR (Primer 001: 5'ATT ATG AGC ACG ACA GAC GCC TGA TCT 3', GeneChip Human Mapping 50K Assay-Kit). Die Fragmentgröße wurde anhand eines 2%igen Agarose-Gels überprüft. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit einer MinElute 96 UF PCR Purification Platte (Macherey-Nagel) unter Einsatz einer Vakuum-Pumpe (Vakuum Control Unit, Millipore). Die aufgereinigte DNA wurde mittels DNase I in 20-200 bp große Fragmente zerlegt, die Fragmentation wurde anhand eines 4%igen Agarose-Gels überprüft. Die so generierten DNA-Fragmente wurden anschließend in einer Labelling-PCR mit Biotin markiert und auf die Gene Chip 50K Mapping Arrays (Affymetrix) hybridisiert. Nach 16-stündiger Hybridisierung im Hybridisierungssofen (Affymetrix) wurde die Chip-Matrix gewaschen, gebundene DNA-Moleküle wurden mit fluoreszierendem Streptavidin und Biotin-markierten Anti-Streptavidin-Antikörpern markiert. Das Waschen und Markieren erfolgte vollautomatisch in der Fluidic-Station 400 (Affymetrix). Zur Analyse der Hybridisierung wurden die Chips mithilfe des Scanners 3000 (Affymetrix) gescannt und mittels GCOS 1.4 und GNAT 3.0/4.0 Software (Affymetrix) ausgewertet. Die Software errechnet den Zugewinn bzw. Verlust von chromosomalen Material anhand der unterschiedlichen Konzentration an markierter DNA, die an die 50.000 SNPs auf dem Chip hybridisiert hat.

## 5.4 Proteomische Methoden

### 5.4.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (5 min, 1500 rpm, RT) geerntet und 1-2 mal mit PBS gewaschen. Zu dem Pellet wurde der gleiche Volumenanteil Lysepuffer gegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Zusammensetzung des Lysepuffers variiert je nach Analysemethode (s. nachfolgende Liste Lysepuffer). Die Lyse erfolgt für ca. 10 min auf Eis bei gelegentlichem vortexen. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation (15 min, 12000 x g, 4 °C) von verbleibenden Zelltrümmern getrennt, der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µl des Lysats gegen den Lysepuffer oder Wasser bei OD<sub>280</sub> auf dem Nanodrop gemessen.

#### Lysepuffer B

20 mM Tris, pH 7,5  
0,27 M Sucrose  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1 % Triton X-100  
1 mM Na-Vanadat  
10 mM β-Glycerolphosphat  
50 mM NaF  
0,2 mM PMSF  
5 µg/ml Leupeptin,  
1 mM Bezamidin

#### Lysepuffer D

970 µl Grundlösung (0,1 M Na-Phosphat + 2 mM MgCl<sub>2</sub> + 5 mM EDTA)  
10 µl 50 mM Leupeptin  
10 µl 10 mM PMSF  
10 µl 10%iges CHAPS  
0,201 µl β-ME

#### Lysepuffer P

50 µl Grundlösung (500 mM Tris + 1500 mM NaCl + 50 mM EDTA + 0,5 % Triton)  
10 µl 50 mM Leupeptin  
5 µl 100 mM PMSF  
5 µl 1 M NaF  
5 µl 100 mM Na-Vanadat  
0,10 µl β-ME

#### Lysepuffer I

50 mM Hepes  
150 mM NaCl  
5 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1 % NP40  
Protease-Inhibitoren

**Lysepuffer Ras-Pullout-Assay**

50 mM Tris, pH 7,5

150 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EDTA

1 % NP40

Protease-Inhibitoren

**Protease-Inhibitoren:** 0,1 M Na-Vanadat (0,078 g/ 5 ml), Aliquots 100 µl

1 M NaF (0,21 g/ 5 ml), Aliquots 500 µl

0,1 M Benzamidin (0,092 g/5 ml), Aliquots 500 µl

1 M β-Glycerophosphat

Pepstatin A

Aprotinin

**5.4.2 Eindimensionale Gelelektrophorese (1-DE)**

Die Lysate wurden unter Verwendung des jeweiligen Lysepuffers wie unter 5.4.1 beschrieben hergestellt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Lysepuffer auf 30-60 µg/µl eingestellt. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95 °C 5 min denaturiert. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach dem Laemmli-Prinzip nach den Angaben Maniatis (Zitat) hergestellt. Je nach Anwendung wurden zwischen 5-25 µl Lysat auf die SDS-Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit SDS-Laufpuffer bei 150-180 V ca. 45-60 min in den Protean-Systemen von Biorad.

**Trenngelpuffer**

1,5 M Tris, pH 8,8

**SDS-Laufpuffer**

25 mM Tris

250 mM Glycin

0,1 % SDS

**SDS-Auftragspuffer, 4x**

40 mM Tris-HCl

4 % SDS

10 % β-ME

**Sammelgelpuffer**

1M Tris, pH 6,8

40 % Glycerin

0,002 % Bromphenolblau

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Proteinstandards (Page Ruler, Fermentas, unstained und prestained) mit aufgetragen.

Es wurden aber auch kommerziell erhältliche Tris-Glycin- oder Tris-Tricin-Gele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen mit und ohne Gradienten verwendet. Diese wurden mit MES-/ MOPS-Puffer bei ca. 200 V in der Invitrogen-Kammer aufgetrennt.

**10x MES-Laufpuffer**

500 mM MES

500 mM Tris

1 % SDS

10 mM EDTA

pH 7,3

**10x MOPS-Laufpuffer**

500 mM MOPS

500 mM Tris

1 % SDS

10 mM EDTA

pH 7,7

### 5.4.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt mit Hilfe von immobilisierten pH-Gradienten aufgetrennt (Zitat). In der zweiten Dimension erfolgt nun die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Dadurch wird eine bessere Auftrennung des Proteingemisches erreicht, ohne dass zusätzliche Vorfraktionierungsschritte wie unter 5.4.7 beschrieben benötigt werden.

Die 2-DE wurde nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellpellets von KCL-22 S und -R (je ca.  $1 \times 10^8$  Zellen) mit Lysepuffer D bzw. P wie oben beschrieben lysiert (s. 5.4.1). Die gleiche Menge an Protein (ca. 200 µg) wurde mit 20 % TFA/ 50 % Aceton für 30 min bei -20 °C und für 2 h bei 4 °C gefällt, anschließend wurde das Pellet zweimal mit 80 %igem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde in ca. 250 µl Rehydratisierungspuffer über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Von der so vorbereiteten Proteinlösung wurden je 125 µl auf Immobiline Dry Strips (Amersham, pH 3-10, 7 cm) über Nacht in einem *Resolving Tray* equilibriert. Die Strips wurden mit je 3 ml Cover Fluid bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die isoelektrische Fokussierung wurden mit folgendem Programm durchgeführt: 1 min 500 V, 1 h 30 min von 500 auf 3500 V, 4 h bei 3500 V, 1 min von 3500 auf 500 V, 30 min bei 500 V. Die Strips wurden im Vorfeld der zweiten Dimension DTT (100 mg in 10 ml Equilibrierungspuffer für 10 min) und IAA (250 mg in 10 ml Equilibrierungspuffer + Bromphenolblau für 10 min) behandelt, um Modifikationen der Proteine zu vermeiden. Die so vorbereiteten Streifen wurden in vorgefertigte Gele (IPG-well, Tris-Glycin, 4-12 %, Invitrogen) überführt und mit MES/MOPS-Laufpuffer (s. 1DE) bei 125 V für ca. 60 min aufgetrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit S-Coomassie wie nachfolgend beschrieben.

#### Rehydratisierungspuffer

8 M Urea  
2 % Chaps (w/v)  
0,002 % Bromphenolblau (w/v)  
0,2 % DTT (w/v)

IPG-Puffer entsprechend verwendeter Strips

#### Equilibrierungspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 6,8  
6 M Urea  
2 % SDS  
30 % Glycerol

Der Versuchsaufbau mit Fällung der Proteine stellte sich als nachteilig heraus, da die pelletierten Proteine sich nur unvollständig wieder lösen ließen und dadurch sich die Vergleichbarkeit der Proben im *Protein profiling* verschlechterte. Deshalb wurden die Zellen direkt in Rehydratisierungspuffer (7 M Urea, 2 % Chaps, 1 % DTT) lysiert, zentrifugiert und anschließend der Proteingehalt des Überstandes mittels Nanodrop-Messung bestimmt. Es wurde eine Proteinkonzentration von 200-400 µg in 125 µl Rehydratisierungspuffer eingestellt und Bromphenolblau und die 2,5 µl des IPG-Puffers zugegeben. Der nachfolgenden Versuchsteile werden wie oben beschrieben durchgeführt.

### 5.4.4 Proteinfärbung mit Coomassie und Silber

Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurden sie mit zwei verschiedenen Methoden angefärbt. Die Coomassiefärbung wurde vor allem für das Protein profiling aus 1D- und 2D-Gele verwendet, da hier größere Proteinkonzentrationen- und Mengen vorhanden waren. Hierbei wurde eine spezielle, sensitive Coomassiefärbung nach Kang et al. (100) verwendet. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung geschwenkt und anschließend je nach Färbegrad 12-24 h bei entfärbt. Die



Spots bzw. Banden von Interesse wurden ausgeschnitten und wie unter 5.4.5 beschrieben für den Verdau vorbereitet.

#### **S-Coomassie-Färbelösung**

10 % Aluminiumsulfat (w/v)

20 % Ethanol

5 % Phosphorsäure

0,002 % Coomassie G-250

#### **Entfärber**

20 % Ethanol

5 % Phosphorsäure

Um Gele von Protein-Interaktionsstudien (s. Immunpräzipitation 5.4.8) anzufärben, wurde wegen der geringen enthaltenen Proteinmengen eine Silberfärbung durchgeführt. Die Verwendung von Formaldehyd statt Glutaraldehyd ermöglicht trotz Silberfärbung eine anschließende massenspektrometrische Analyse und Identifizierung. Die Gele wurden in Kooperation mit der AG Schrenk, FZL Lobeda, FSU Jena, zunächst für 1 h fixiert und anschließend mit Natriumthiosulfat (0,1 mg/ml) inkubiert. Zwischen mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde für 20 min mit Silbernitrat (0,1 g in 0,5 % Formaldehyd) inkubiert und anschließend bis zum gewünschten Ergebnis entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe 5%iger Essigsäure gestoppt und das Gel nach zweimaligem Waschen in Wasser in 1%iger Essigsäure gelagert.

#### **Fixierer**

50 % Methanol

12 % Essigsäure

0,5 % Formaldehyd

#### **Entwickler**

6 % Natriumcarbonat

0,5 % Formaldehyd

0,1 mg/ml Natriumthiosulfat

### **5.4.5 Identifizierung durch Peptide Mass Fingerprint**

Proteine können mit Hilfe von Trypsin in charakteristische Fragmente zerlegt werden. Durch eine massenspektrometrische Analyse des Peptidspektrums können die Ausgangsproteine mittels Datenbankanalyse und Literaturrecherche analysiert werden (101). Dafür wurden die ausgeschnittenen Spots und Banden in vier Schritten entfärbt und dehydriert. Die Gelstücke wurden in 300 µl Puffer A für 1 h und nach Pufferwechsel nochmals 30 min unter Schütteln entfärbt. Anschließend wurden die Gelstücke zweimal 10 min in 300 µl Puffer B und 1 h in 300 µl Puffer C geschüttelt. Zur Dehydrierung wurden die Stücke für 15 min in 50 µl Puffer D inkubiert und danach in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Verdau mit 10-20 µl Trypsinlösung erfolgte bei 30-37 °C über Nacht. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit Hilfe von Gold-Chips (CIPHERGEN) durchgeführt. Dafür wurden zweimal 2 µl des Verdauansatzes auf einem Spot eingetrocknet und anschließend zweimal mit 0,5 µl Energie-absorbierende Matrix (EAM) versetzt. Zur Kalibrierung jedes gemessenen Chips wurde ein Peptidstandard aus sieben Peptiden (PS7, CIPHERGEN, 0,1 µl in 1 µl EAM) mit aufgetragen. Die Messung mittels SELDI-TOF-MS wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Laserintensität: 1600 nJ, Messbereich: 500-6000 Da, Schüsse pro Spot: 795. Zur Auswertung wurde die Profound-Datenbank (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>) genutzt.

#### **Puffer A**

10 % Methanol

40 % Essigsäure

#### **Puffer B**

100 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8

#### **Puffer C**

50 % ACN

100 mM Am-bicarbonat

<b>Puffer D</b>	<b>Trypsinlösung</b>	<b>EAM</b>
100 % Acetonitril	25 mM Ammoniumbicarbonat Trypsin Gold (Promega)-Stocklösung	20 % CHCA

#### 5.4.6 Western Blot

Für die Detektion und Analyse von Proteinen mittels Antikörpern wurden diese zunächst mittels *wet-blot*-Verfahren aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 150 mA pro Gel mit Transferpuffer für mindestens 2 h bei 4 °C. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine mit 4 %igem Milchpulver bzw. 5 %igem BSA in TBS-T abgesättigt. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T und TBS für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran wie beschrieben gewaschen, für 1 h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion erfolgte je nach Versuch und verwendetem sekundären Antikörper mittels Alkalischer Phosphatase-Reaktion (AP) oder durch Meerrettich-Peroxidase-Reaktion (*horse-reddish-peroxidase*, HRP). Für die AP-Reaktion wurden 10 ml des AP-Puffers mit 100 µl NBT und 50 µl BCIP nach Sicht mit der Membran inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS gestoppt. Wurde ein HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, wurde die Membran für 1 min mit der ECL-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Filmbox eingeklebt. In der Dunkelkammer wurde nun ein Fotofilm aufgelegt und für einige Sekunden bis Stunden exponiert. Sowohl die AP- als auch die HRP-entwickelten Western Blots wurden eingescannt und für die vergleichende Analyse mit Hilfe der Image J-Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und MS Excel ausgewertet.

<b>Transfer-Puffer</b>	<b>TBS-T, 10x</b>	<b>TBS, 10x</b>
100 mM Tris-HCl	250 mM Tris, pH 7,5	250 mM Tris-HCl pH 7,5
767 mM Glycin	1,37 M NaCl	1,37 M NaCl
20 % Methanol	27 mM KCl	27 mM KCl
	0,5 % Tween-20	

**primärer AK (10 ml):** 9,5 ml 1xTBS, 0,5 ml FCS, 25 µl Na-Azid, x µl AK je nach Verdünnungsfaktor

**sekundärer AK-Verdünnungspuffer:** 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, x µl AK je nach Verdünnungsfaktor

#### **AP-Puffer**

100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM Tris, pH 9,5

**BCIP:** 0,5 g BCIP in 10 ml 70% Dimethylformamid

**NBT:** 0,5 g NBT in 10 ml 70% Dimethylformamid

#### 5.4.7 Massenspektrometrie mittels SELDI-TOF-MS

Für die Erstellung von Protein-Profilen mittels SELDI-TOF-MS können durch die Verwendung verschiedener chromatographischer Oberflächen komplexe Proteingemische, z.B. Gesamtzelllysate

oder Seren analysiert werden (102). Trotzdem ist es zur Verbesserung des Auflösungsvermögens der massenspektrometrischen Analyse hilfreich, eine Aufreinigung der Proben mit Hilfe von Säulen, die Proteine entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften binden, durchzuführen. Auch die Verwendung von möglichst einheitlichem Zellmaterial, z.B. nach Laserbasierter Mikrodissektion (103) oder durch Verwendung von Einzelzellklonen verbessern die Aussagekraft der Ergebnisse. Die Fraktionierung erfolgte zum einen mit dem QHyperD-Kit (Ciphergen) nach Herstellerangaben, wobei die Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt durch Elution mit Puffern verschiedener pH-Werte getrennt werden. Es entstehen sechs Fraktionen (pH 9, pH 7, pH 5, pH 4, pH 3 und eine organische Fraktion). Zum anderen wurden sogenannte *reverse phase chromatography* (RPC)-Beads verwendet, die die Proteine entsprechend ihrer Hydrophobizität durch Elution mit steigenden Konzentrationen an Acetonitril und 0,1 % TFA trennen. Es entstehen acht Fraktionen (10-70 und 100 % ACN). Die so fraktionierten Proben wurden anschließend mit verschiedenen chromatographischen Chip-Oberflächen (IMAC-Kupfer, Q-10, CM-10) massenspektrometrisch analysiert. Die detaillierten Protokolle finden sich in einer Reihe von Publikationen der AG CUCA (104;105). Kurz zusammengefasst, wurden die Chips mit 5 µl des entsprechenden Bindepuffer (s. u.) für 5 min inkubiert und die Spots mehrfach mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden 5 µl der Probe, verdünnt in Bindepuffer, zwischen 30 und 90 min in einer feuchten Kammer auf dem Chip inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden mit Bindepuffer abgewaschen, überschüssige Salze anschließend mit Wasser entfernt. Die Probe wurde zweimal mit 0,5 µl EAM versetzt und mit folgenden Programmen massenspektrometrisch analysiert: low: 2-20 kDa, 1500 nJ, high: 2-200 kDa, 3000 nJ. Die Auswertung erfolgte mit dem Ciphergen Express Client 3.0, MS Excel sowie der Expasy-Protein-Datenbank (<http://expasy.org/sprot/>).

<b>IMAC-Bindepuffer</b>	<b>Q10-Puffer</b>	<b>CM-10-Puffer</b>
0,5 M NaCl in PBS	0,1 M Tris, pH 8,5	0,1 M Na-Acetat pH 4,5
0,1 % Triton X-100	0,02 % Triton X-100	0,02 % Triton X-100

#### **EAM**

5 mg SPA in 125 µl ACN und 125 µl 1%iger TFA

#### **5.4.8 Immunpräzipitation (IP)**

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen oder für die Bestimmung von Proteinaktivitäten wurden die Zielproteine mit Hilfe spezifischer Antikörper an Matrix-Moleküle wie Protein-G/A-Sepharose oder magnetische Beads gekoppelt. Angelehnt an die Publikation von Alessi et al. (106) wurden die Zellen der Zelllinien KCL22-S und -R mit kaltem Puffer B 10 min auf Eis lysiert und bei 12000xg 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Nanodropmessung bestimmt und gleiche Proteinkonzentrationen (40-50 µg/µl in 200-300 µl-Ansatz) für die IP eingesetzt. Zu dem Proteinlysats wurden 1-2 µg des spezifischen Antikörpers gegeben und 1 h unter Schütteln (1000 rpm) bei 4 °C inkubiert. Zu dem Ansatz wurden ca. 80 µl gewaschene Protein-G-Sepharose (1:4 mit Sepharose ohne Protein-G gemischt) gegeben und 2-3 h bzw. über Nacht auf einem Kopf-über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit 500 µl Puffer B + NaCl und Puffer C gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden mit Elutionspuffer eluiert und anschließend in 4xSDS-Auftragspuffer (s. 1DE) aufgekocht oder direkt in 50 µl 4xSDS-Auftragspuffer aufgekocht. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels 1DE.

Für die magnetischen Beads erfolgte die Antigen-Antikörper-Bindung wie oben beschrieben. Anschließend wurden 50 µl Protein-G-Microbeads zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei binden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem Fc-Teil des Antikörpers an das Protein-G auf der Matrixoberfläche. Diese Beads wurden nun auf spezielle Säulen gegeben, die sich in einem Magnetfeld befanden. Die Beads binden an die Säulen und können mit relativ wenig Verlust stringent gewaschen werden (Puffer B). Der Interaktionskomplex wurde mit 0,1 M Triethylamin, pH 11,8, 0,1 % Triton X-100 eluiert, die Neutralisierung des Triethylamins erfolgte mit 3 µl 1 M MES pH 3. Die Analyse der Proben mittels Gelelektrophorese erfolgte wie oben beschrieben.

#### **Lysepuffer B**

20 mM Tris, pH 7,5  
0,27 M Sucrose  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1 % Triton X-100  
1 mM Na-Vanadat  
10 mM β-Glycerophosphat  
50 mM NaF, 0,2 mM PMSF  
5 µg/ml Leupeptin  
1 mM Benzamidin

#### **Puffer B + 0,6 M NaCl**

wie B + x ml 5 M NaCl

#### **Puffer C**

50 mM Tris, pH 7,5  
0,03 % Brij 35  
0,1 mM EGTA

Bei bestimmten Antigengrößen können Banden im Gel bzw. Western Blot oder Peaks in der massenspektrometrischen Analyse, die durch Antikörperfragmente entstehen, störend sein. Zur Lösung dieses Problems können Antikörper via Cross Link kovalent an die Trägermatrix gekoppelt und der Antigenkomplex mit speziellen Elutionspuffern (pH-Sprung, s. o.) vom Antikörper gelöst werden. Dazu wurden Antikörper für 1 h bei RT mit der Trägermatrix inkubiert, die ungebundenen Antikörper abgewaschen (0,2 M Natriumborat, pH 9) und die Antikörper durch Zugabe von Dimethylpimelimidat (20 mM in 0,2 M Natriumborat, pH 9) für 30 min bei RT mit der Matrix quervernetzt. Durch Zugabe von 0,2 M Ethanolamin, pH 8 für 2 h bei RT wurde die Reaktion abgestoppt und die so vorbereitete Matrix in PBS bei 4 °C gelagert.

#### **5.4.9 Herstellung rekombinanter Proteine**

Für die Analyse der Kinaseaktivität von B-Raf und C-Raf mittels MBP-Reaktion (s. 5.4.10) ist die synthetische Herstellung von Mek und Erk notwendig. Diese werden für die Aufreinigung GST- bzw. His-gekoppelt. Die Herstellung erfolgte modifiziert nach den Angaben in der Publikation von Keilhack et al. (107) in Kooperation mit Dr. Ignacio Rubio in der AG Molekulare Zellbiologie der FSU Jena. Kurz zusammengefasst wurden die bereits transformierten Bakterien in LB-Medium inkubiert, die Proteinexpression mit IPTG für einige bei RT induziert, die Bakterien geerntet und anschließend in TBN-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Nach Zugabe von Lysozymlösung (5 mg in 100 µl TBN-Puffer) und 500 mM EDTA pH 8,5/Triton X-100 und jeweils 20 min Inkubation bei RT wurden die Bakterien in der Ultrazentrifuge für 30 min bei 30.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in EQM-Puffer resuspendiert und das Lysat wurde auf die Säule mit Glutathion-Sepharose gegeben. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die schrittweise Elution mit Puffer EQL, der Glutathion enthält. Die Fraktionen wurden über Nacht gegen Puffer C bzw. gegen Puffer C mit 50 % Glycerol und

0,15 M NaCl dialysiert. Die Fraktionen wurden mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung sowie photometrisch per Bradford-Messung hinsichtlich Reinheit und Ausbeute analysiert.

<b>TBN-150-Puffer</b>	<b>EQM-Puffer</b>	<b>EQL-Puffer</b>	<b>Puffer C</b>
25 mM Tris, pH 7,5	50 mM Tris, pH 8,0	EQM	50 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl	100 mM NaCl	10 mM Glutathion	0,03 % Brij35
10 mM Beta-ME	10 mM DTT		0,1 mM EGTA
+Protease-Inhibitoren	0,1 % Beta-ME		

#### 5.4.10 Enzymaktivitätsassays

Für die Analyse der Ras-Aktivität wurde GTP-gebundenes Ras (aktives Ras) an eine rekombinante Ras-Bindedomäne gebunden (GST-Raf1, RBD). Diese Bindung ist selektiv für aktives Ras, Ras-GDP kann nicht binden. Somit kann diese Methode verwendet werden, um die Menge an aktivem Ras in einer Probe zu untersuchen (108). Für den sogenannten Ras-Pullout-Assay wurden die Zellen kurzzeitig ohne Serum kultiviert und anschließend über Nacht in Medium mit 0,5 bzw. 10 % FCS und 1  $\mu$ M Imatinib bzw. als Kontrolle mit PBS kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, in Lysepuffer (Ras-Pullout-Assay, s. 5.4.1), der die Ras-Bindedomäne enthält, 10 min auf Eis lysiert und anschließend zentrifugiert (15.000 rpm, 20 min, 4 °C). Dabei binden die Ras-GTP-Moleküle an die Ras-Bindedomäne. Der Überstand wurde für 30 min bei 4 °C mit Glutathion-Sepharose inkubiert, um die Ras-Bindedomäne, welche GSH-gekoppelt ist, aus dem Lysat zu präzipitieren. Der Ansatz wurde mehrmals mit Lysepuffer gewaschen, abschließend nochmals zentrifugiert und der Überstand über der Sepharose mit SDS versetzt, aufgeköcht und mittels 1DE und Western Blot gegen Ras analysiert. Als Kontrolle wurde auch das Gesamtlisat aller Proben gegen Ras geblottet, um die Menge an Gesamt-Ras (Ras-GTP + Ras-GDP) in der Probe zu bestimmen.

Für die Analyse der Kinaseaktivität von B-Raf und C-Raf wurden die Zellen der Zelllinie KCL22-S und -R ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml, 8 ml Kulturansatz) mit steigenden Imatinib-Konzentrationen (0,1-10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. Die Proteine B-Raf und C-Raf wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper (4.2), wie unter 5.4.8 beschrieben, präzipitiert. Die Ansätze wurden nach dem Waschen in je 30  $\mu$ l Puffer C aufgenommen und bei 30 °C inkubiert (B-Raf: 20-25 min, C-Raf: 30 min). Puffer C enthält die Kinasen Mek und Erk, die wie unter 5.4.9 beschrieben hergestellt wurden. Diese Kinasen wurden nun je nach Aktivität von B-Raf und C-Raf phosphoryliert. Von diesem Kinase-Reaktionsansatz wurden 5  $\mu$ l zu 45  $\mu$ l MBP-Puffer gegeben und 10 min bei 30 °C inkubiert. Der MBP-Puffer enthält das Myelin-Basic-Protein (MBP), welches ein synthetisches Substrat von Erk darstellt. Je nach Aktivitätszustand von Erk wird radioaktives ATP auf MBP übertragen. Die MBP-Reaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu$ l 4xSDS-Auftragspuffer und Aufkochen gestoppt. 20  $\mu$ l jedes Ansatzes wurden auf ein 4%iges SDS-Gel aufgetragen und über Nacht bei 4 mA aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, entfärbt, gewaschen und vor der Trocknung 10 min mit 10%iger Glycerol-Lösung inkubiert. Die Exposition verfolgte für 30 Sekunden bis über Nacht, je nach Aktivität. Die Filme wurden eingescannt und mit Hilfe der ImageJ-Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) und MS Excel ausgewertet. Zur Kontrolle, ob gleiche Mengen B-Raf und C-Raf in die Reaktion eingesetzt wurden, wurden 10-20  $\mu$ l der IPs auf 10%ige Gele aufgetragen und mittels Western Blot gegen B-Raf und C-Raf analysiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Kinase-Reaktionen wurde ein Ansatz mit unspezifischem Antikörper (Normal-Mouse-IgG), ein Ansatz ohne Mek bzw. Erk in Puffer D und ein Ansatz mit *Blocking Peptide* gegen den spezifischen Antikörper mitgeführt.

<b>Puffer D</b>	<b>Puffer D (Fortsetzung)</b>	<b>MBP-Puffer</b>
50 mM Tris, pH 7,5	0,33 mM ATP	25 mM Tris, pH 7,5
0,03 % Brij 35	+ Mek	0,1 mM EGTA
0,1 mM EGTA	+ Erk	MBP (0,33 mg/ml)
3,4 µM Microcystin		10 mM Mg-Acetat
0,27 mM Na-Vanadat		0,1 mM [ $\gamma^{35}$ -P]-ATP
13,3 mM Mg-Acetat		
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	<b>Entfärber</b>	
0,25 % Coomassie G 250	50 % Ethanol	
50 % Ethanol	10 % Essigsäure	
10 % Essigsäure		

## 5.5 Statistik

Für die SELDI-Analysen wurde mit der CiphergenExpress-Software für die einzelnen Peaks der p-Wert bestimmt, um die Signifikanz der Ergebnisse zu untersuchen. Dabei wurden Messwerte mit einem p-Wert von  $> 0,05$  (entspricht einem Signifikanzniveau von 5 %) als diskriminierend gewertet. Der p-Wert (auch Irrtumswahrscheinlichkeit genannt) gibt die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art an, also die Wahrscheinlichkeit, eine gültige Nullhypothese zu verwerfen, wenn man die Nullhypothese aufgrund der beobachteten Daten ablehnt (Quelle: Wikipedia).

Weiterhin wurde der Wert AUC (Area Under Curve, die Fläche unter der ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) ermittelt, um die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Peaks für die untersuchte Probe zu bestimmen. Je näher dieser Wert an 1 liegt, desto aussagekräftiger sind die detektierten Peaks für die Identifikation einer Probe.

Außerdem wurden bei wiederholten Messungen

Mittelwert ( $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ , wobei x die Summe und n die Anzahl aller Beobachtungen ist),

Median ( $\tilde{x} = \tilde{U} + b \left( \frac{n/2 - (\sum f)_U}{f_{Median}} \right)$ , wobei  $\tilde{U}$  die untere Klassengrenze der Medianklasse, b die

Klassenbreite und  $(\sum f)_U$  die Summe der Häufigkeitswerte aller Klassen unterhalb der Medianklasse und  $f_{Median}$  die Anzahl der Werte in der Medianklasse ist),

Standardabweichung ( $s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})}{n-1}}$ ),

Varianz (Quadrat der Standardabweichung s) und

Standardfehler ( $s_{\bar{x}} = \sqrt{s^2 / n}$ ) berechnet.

Die Streuung wurde über die Spannweite R (*range*;  $R = x_{\max} - x_{\min}$ ) angegeben.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Beweis der Imatinib-Resistenz der Zelllinie KCL22-R sowie Ausschluss von bekannten Resistenzmechanismen

#### 6.1.1 Zellproliferation und Apoptose

Für die Analyse der Zellproliferation wurden die Zellen mit einer Anfangskonzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml mit einem Gesamtvolumen von 3 ml in 12-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 8 Tage mit 1  $\mu$ M Imatinib bzw. PBS als Kontrolle behandelt. Für die Analyse mittels automatischer Zellzählung (CASY), Bestimmung der ATP-Menge als Indikator für die Menge an proliferierenden Zellen sowie Messung der Caspase 3/7-Aktivität als Indikator für die Apoptose wurde täglich 1 ml Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium und Imatinib ersetzt. Wie die Abb. 13 und die Daten der Tabelle 14 (s. Anhang) zeigen, sind die Zellen der Imatinib-sensitiven Zelllinie KCL22-S nicht in der Lage, in Anwesenheit von 1  $\mu$ M des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib zu proliferieren. Bereits nach 2 Tagen unterscheidet sich die gemessene Zellzahl zwischen behandelter (+IM) und unbehandelter (Co) Probe deutlich ( $7,33 \times 10^6$  Zellen im Vergleich zu  $4,34 \times 10^6$  Zellen), am Ende des Versuchs beträgt der Unterschied sogar mehr als eine Zehnerpotenz ( $1,81 \times 10^7$  Zellen zu  $0,97 \times 10^6$  Zellen), was eine Reduktion der Proliferation um mehr als 98 % bedeutet. Die Imatinib-resistente Zelllinie KCL22-R hingegen zeigt nahezu keine Reaktion auf die Imatinib-Behandlung. Während der ersten 2 Tage verhalten sich behandelte und unbehandelte Probe identisch. Von Tag 3-5 ist das Wachstum der Imatinib-behandelten Zellen leicht reduziert (durchschnittlich um 12 %), was sich jedoch am Versuchsende ins Gegenteil umkehrt (s. Abb. 14). Die ATP-Messung zeigte ähnliche Ergebnisse, daher wurden die Daten hier nicht im Detail beschrieben.

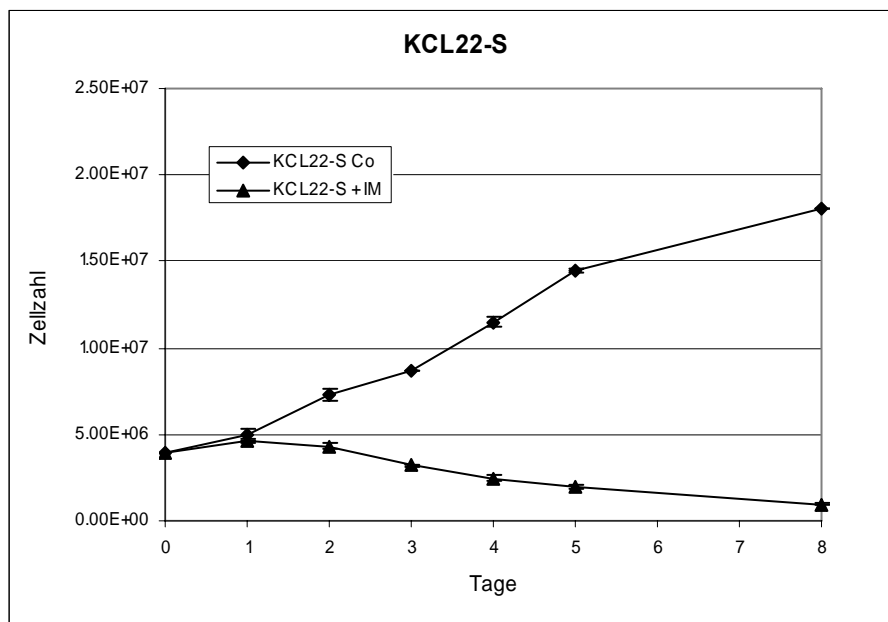


Abb. 13: Zellproliferation von KCL22-S in An- und Abwesenheit des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib. Die sensitive Zelllinie kann unter 1  $\mu$ M Imatinib (+IM) im Vergleich zur Kontrolle (Co) nicht wachsen.

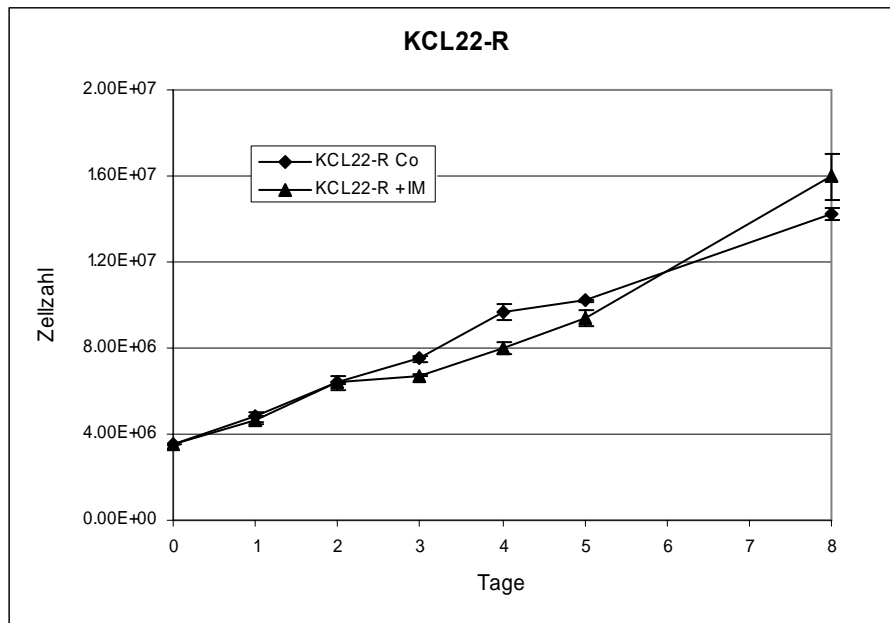


Abb. 14: Zellproliferation von KCL22-R in An- und Abwesenheit des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib. Bei der resistenten Zelllinie ist kaum ein Unterschied zwischen behandelter (IM) und unbehandelter Probe (Co) messbar.

Die Analyse der Apoptose nach 24-stündiger Imatinib-Gabe zeigt, dass die Behandlung bei der sensitiven Zelllinie zu einer Erhöhung der Caspase3/7-Aktivität um mehr als 50 % führt, während die Zellen der resistenten Zelllinie sogar eine Reduktion der Caspase-Aktivität und somit eine um ca. 8 % verringerte Apoptose zeigen (s. Abb. 15 und Tabelle 8, Anhang).

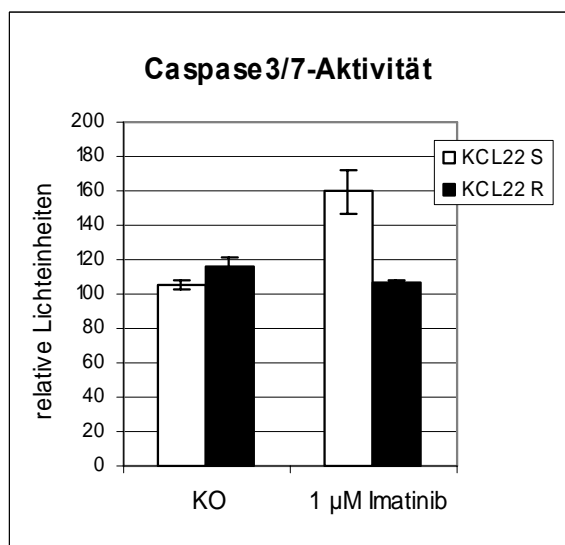


Abb. 15: Apoptosemessung nach Imatinib-Behandlung: Die sensitiven Zellen zeigen einen deutlich messbaren Anstieg der Apoptose um ca. 50 %, bei den resistenten Zellen ist sogar ein leichter Rückgang der Apoptose nach Imatinibgabe zu beobachten.

### 6.1.2 BCR-ABL-Expression, Sequenzierung der ATP-Bindestelle und Suche nach FLT-3-Mutationen

Eine Resistenz gegenüber Imatinib kann unter anderem durch eine Überexpression von BCR-ABL oder durch Mutationen in der ATP-Bindestelle von BCR-ABL hervorgerufen werden (s. 2.6). Mittels quantitativer PCR wurde das Expressionsniveau von BCR-ABL gegen das Referenzgen Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) gemessen. Wie in der Abb. 16 gezeigt, konnte für KCL22-S ein Wert von 0,32 und für KCL22-R von 0,47 ermittelt werden.



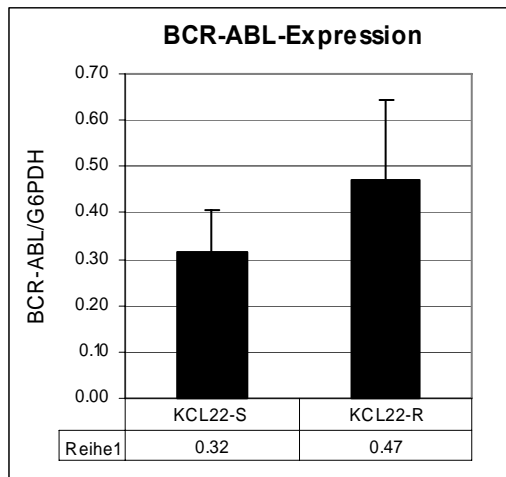


Abb. 16: mRNA-Expressionsniveau von BCR-ABL im Vergleich zum Referenzgen G6PDH. KCL22-R zeigt ein leicht erhöhtes Level im Vergleich zur sensitiven Zelllinie.

Die Sequenzierung der ATP-Bindestelle zeigte bei der resistenten Zelllinie eine Veränderung der 894. Base der codierenden Sequenz von A zu G (s. Anhang 13.1.1). Die Mutation betrifft allerdings die dritte, sogenannte *wobble*-Base, des Triplets. Daher verursacht der Basenaustausch keine Veränderung in der Aminosäureabfolge des Proteins. In Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Scholl, KIM-II Klinikum der FSU Jena wurde die DNA der Zelllinien KCL22-S und -R wie in der Arbeit von Scholl et al. (109) beschrieben, auf FLT-3-Mutationen untersucht. Mutationen innerhalb des FLT3-Gens (fms-like tyrosine kinase 3) werden häufig bei Patienten mit AML gefunden und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (110). Es konnten keine Veränderungen in den untersuchten Bereichen des FLT-3-Gens nachgewiesen werden.

### 6.1.3 Analyse der BCR-ABL-Auto-Phosphorylierung

Imatinib als Tyrosinkinase-Inhibitor verhindert durch die Anlagerung ins aktive Zentrum der Kinase die Übertragung von ATP auf Tyrosinreste. Auch die BCR-ABL-Autophosphorylierung wird dadurch inhibiert und somit die Rekrutierung weiterer BCR-ABL-Moleküle unterbunden (s. Einleitung). Der Nachweis dieser Inhibition kann somit als Beweis für die Wirksamkeit von Imatinib bewertet werden. Dafür wurden die Zellen der Zelllinien KCL22-S und -R zunächst für 24-48 h mit steigenden Dosen Imatinib (0,1-10  $\mu$ M) behandelt, geerntet, lysiert und ein Western-Blot zum Nachweis der phosphorylierten Proteine durchgeführt. Um zu zeigen, dass die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Proben zusätzlich gegen  $\beta$ -Aktin geblottet. Der Versuch zeigte, dass die Menge an phosphoryliertem Abl sowohl in der sensitiven als auch in der resistenten Zelllinie durch die Behandlung mit 1  $\mu$ M Imatinib effektiv reduziert wurde. Bei der KCL22-S war bereits eine 0,1  $\mu$ M-Dosierung ausreichend, um die Phosphorylierung um mehr als 90 % zu reduzieren, während dies bei der KCL22-R erst bei 1  $\mu$ M erreicht werden konnte (Abb. 17).

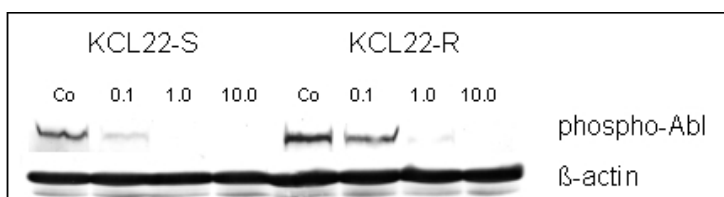


Abb. 17: Western Blot zur Bestimmung der Menge an phosphoryliertem Abl. Bereits 0,1-1,0  $\mu$ M Imatinib führen bei beiden Zelllinien zu einer Verminderung der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Co).

### **Zusammenfassung**

Imatinib hemmt die Zellproliferation in KCL22-S und löst Apoptose aus, erzielt jedoch in KCL22-R keinen Effekt. Als Ursache für diese Resistenz konnten eine BCR-ABL-Überexpression und mutagene Veränderungen in der ATP-Bindestelle von BCR-ABL sowie Mutationen im FLT-3-Gen ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Imatinib in beiden Zelllinien die BCR-ABL-Autophosphorylierung bei einer Konzentration von 0,1-1  $\mu\text{M}$  inhibiert, d.h. sowohl in KCL22-S als auch in KCL22-R kein aktives BCR-ABL nach Imatinib-Therapie mehr vorhanden war.

## **6.2 Analyse der chromosomalen Veränderungen**

Bei Leukämien werden neben der als ursächlich für die Leukämieentwicklung angesehenen BCR-ABL-Genfusion häufig noch zusätzliche Abberationen gefunden. Abberationen, die den Grad der Resistenz gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib beeinflussen, sind bisher allerdings nicht bekannt. Um diesem Aspekt weiter nachzugehen, wurden die sensitiven und resistenten Klone der Zelllinie KCL22 mittels zytogentischer und molekular-zytogenischer Methoden auf ihre Veränderungen im Karyogramm hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind bereits veröffentlicht (111) und können wie folgt zusammengefasst werden:

### **6.2.1 M-FISH**

Die Untersuchung der Zelllinien KCL22-S und -R mit Ganz-Chromosomen-Sonden ergab ein charakteristisches Muster für jede Zelllinie:

#### **Karyotyp KCL22-S (Abb. 18A):**

48~51,X,X,+der(1)t(1;10)(p13;?),+6,+der(8)t(8;21)(p21;q?),der(9)t(9;22)(q34;q11),der(7)t(17;1),-22,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[cp10]

#### **Karyotyp KCL22-R (Abb. 18B):**

48~51,XX,+der(1)t(1;10)(p13;?),+der(6)t(6;13)(p11.1;q12),+8,+der(8)t(8;21)(p21;q?)der(9)t(9;22)(q34;q11),13,der(17)t(17;19),22,+der(22)t(9;22)(q34;q11)x2[cp8]/  
49~50,XX,idem,der(6)t(6;13)(p11.1;q12),+der(6)t(3;13;6)(?;p12;p11.1)[cp2].

Die sensitive Zelllinie wies eine Trisomie 8 auf, während bei den resistenten Zellen immer eine Tetrasomie 8 nachweisbar war. Bei allen Metaphasen der resistenten Zelllinie konnte das Fehlen eines Chromosoms 13 beobachtet werden. Dies resultiert aus einer unbalancierten Translokation t(6;13) in der KCL22-R, die zu einer partiellen Monosomie 13 und einer partiellen Trisomie 6 geführt hat. Zudem wurde eine Monosomie X bei der sensitiven Zelllinie nachgewiesen. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass die resistente Zelllinie aus mindestens zwei Klonen besteht, die sich vor allem in dem derivativen Chromosom 6 unterscheiden, dass aus der Translokation t(6,13) resultiert. Die genauen Unterschiede wurden mittels Multicolor-Banding (MCB) untersucht und sind unter 6.2.2 beschrieben.

Weiterhin zeigen beide Zelllinien die für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie im fortgeschrittenen Stadium typischen Veränderungen wie z.B. das Philadelphia-Chromosom (+der(22)t(9;22)(q34;q11), zweimal) sowie das entsprechende reziproke Chromosom 9

(der(9)t(9;22)(q34;q11), jedoch nur in einfacher Form), Veränderungen am Chromosom 1 (+der(1)t(1;10), Chromosom 8 (t(8;21) und Chromosom 17 (t(17;19).

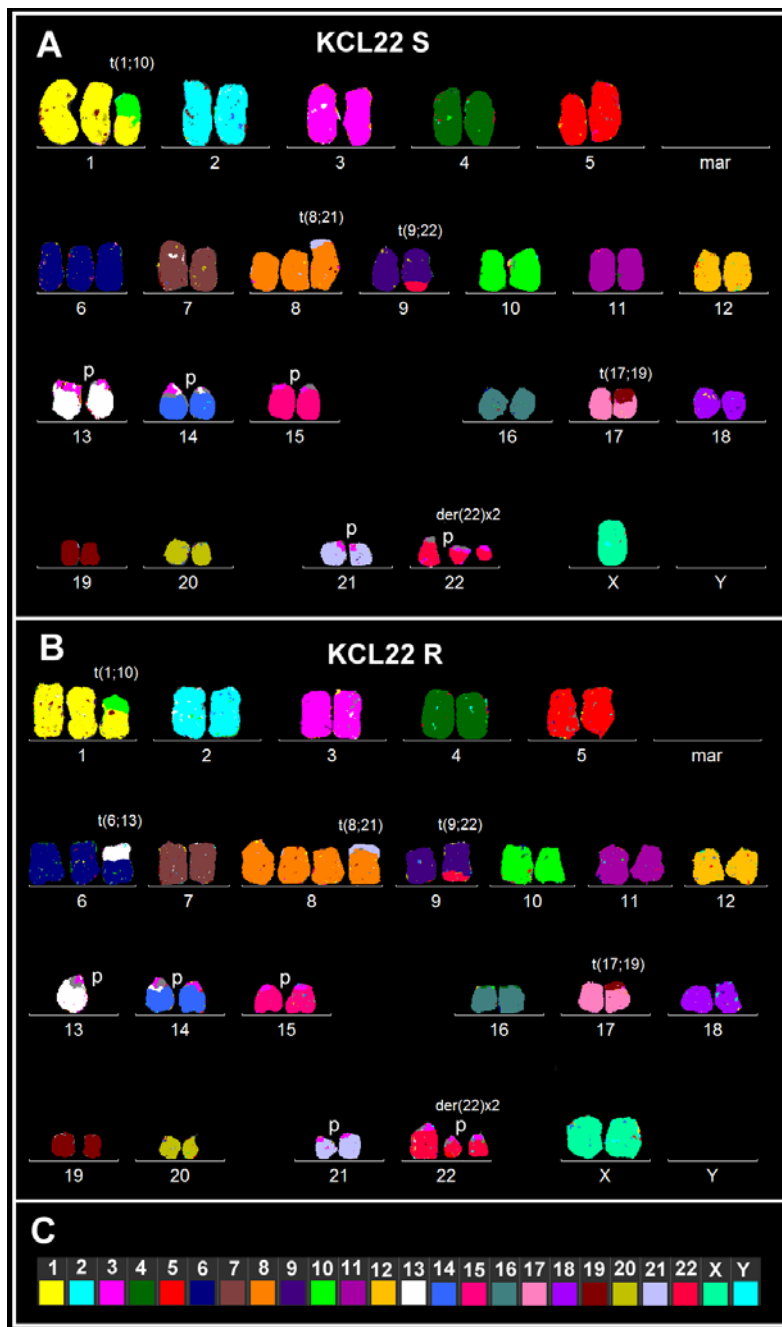


Abb. 18: 24-Farben-FISH der Zelllinie KCL22-S (A) und -R (B) sowie die Farbcodierung für die einzelnen Chromosomen (C).

### 6.2.2 Multicolor-Banding

Um die Bruchpunkte der Translokation t(6;13) genauer bestimmen zu können, wurde eine Multicolor-Banding (MCB)-Analyse der Chromosomen durchgeführt. Dabei wurden markierte DNA-Sonden für Teilbereiche der Chromosomen, sogenannte Mikrodissektionsbanken des interessierenden Chromosoms auf die Metaphasen der Zelllinien hybridisiert (93). In den Abb. 19 und Abb. 20 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt (von links nach rechts: invertiertes DAPI, Falschfarbenbild, einzelne Fluoreszenz-Kanäle: FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5 und DEAC). Mit dieser Methode konnten die Bruchpunkte t(6;13)(p11.1;q12) identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Bruchpunkt auf dem p-Arm von Chromosom 6 bei allen derivativen

Chromosomen identisch ist (p11.1, s. Abb. 19), das Bruchpunktereignis auf Chromosom 13 jedoch unterschiedliche Bereiche betrifft. Es konnten fünf verschiedene derivative Chromosomen nachgewiesen werden, die Menge an transloziertem Material von Chromosom 13 variiert von 13q14 bis zum Telomer (Abb. 20). Die MCB-Analyse lieferte den ersten Hinweise darauf, dass KCL22-R aus Subklonen mit einer Trisomie/ Tetrasomie 8 bzw. einer Disomie/Monosomie für 13q14 besteht.

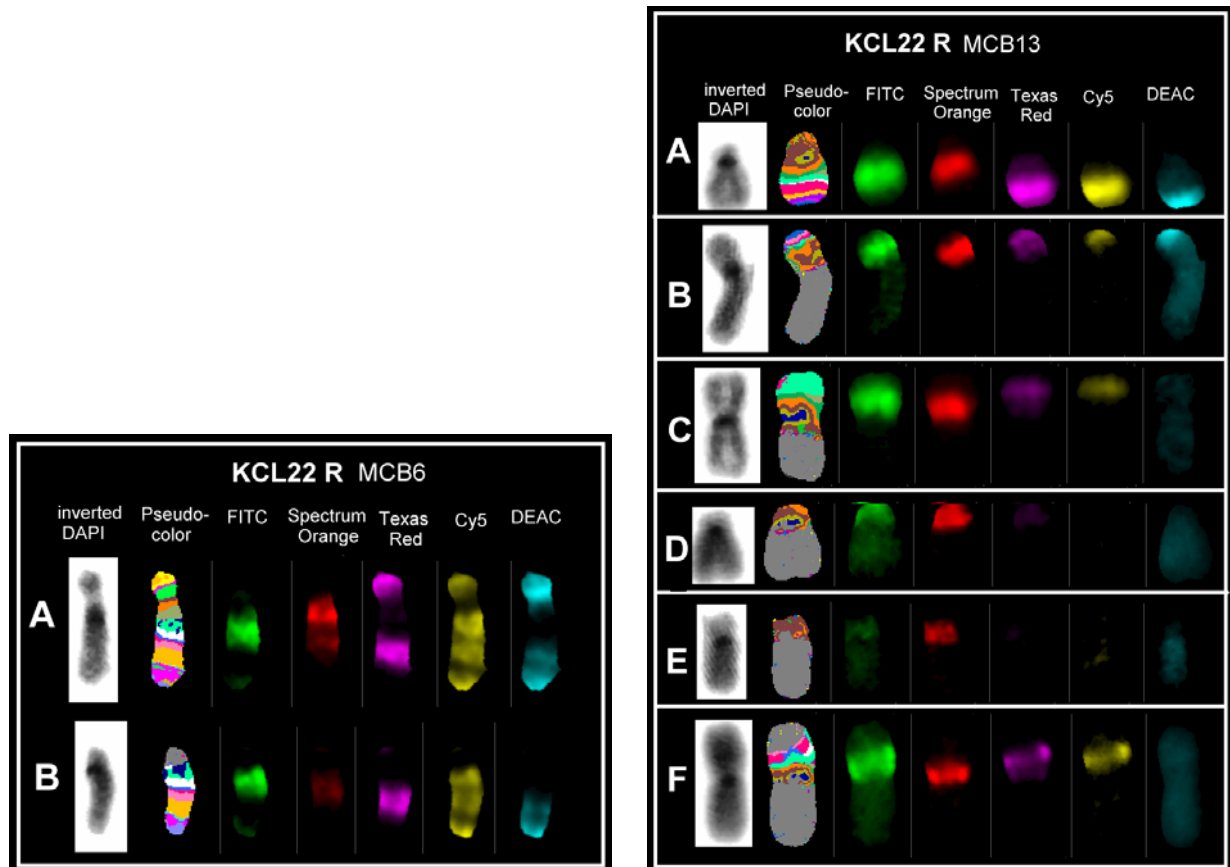


Abb. 19: (A) Normales Chromosom 6

(B) Chromosom der(6)t(6;13)

Abb. 20: (A) Normales Chromosom 13

(B) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13qter)

(C) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13q22)

(D) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13q14)

(E) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13q13)

(F) der(6)t(3;13;6)(6qter→6p11.1::13q12→13q14::3?)

### 6.2.3 Interphase-FISH

Die Klonzusammensetzung wurde mit Hilfe von Interphase-FISH und DNA-Sonden für die Chromosomen 8 (cep8) und 13 (LSI 13q14) quantitativ überprüft. Wie in Abb. 21 gezeigt, beträgt der Anteil der Zellen mit einer Disomie für 13q14 unter dauerhafter Imatinibtherapie ca. 80 % (R+). Wird die Behandlung für einige Tage unterbrochen (A signalisiert den Startpunkt der Therapieunterbrechung), sinkt der Anteil der disomen Zellen auf 30 % (R-). Wird Imatinib wieder hinzugegeben (B), steigt der Anteil an Zellen mit Disomie 13q14 auf das Ausgangsniveau zurück (R+).

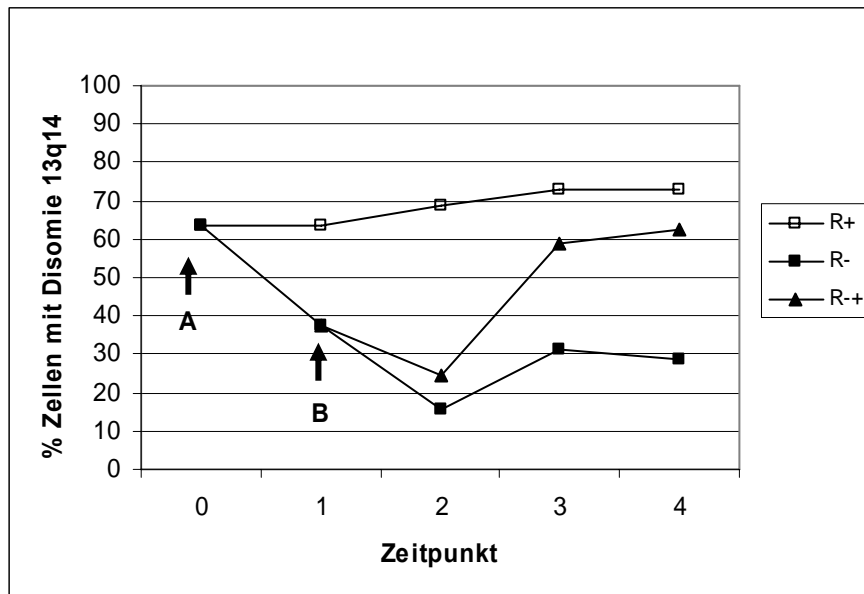


Abb. 21: Anteil der Zellen mit einer Disomie für den Chromosomenabschnitt 13q14, ermittelt mit Interphase-FISH. R+ = dauerhafte Behandlung mit 1  $\mu$ M Imatinib, R- = Imatinibtherapie wurde unterbrochen, R-+ = Imatinibtherapie wurde nach Unterbrechung für einige Tage fortgesetzt.

Auch durch die Verwendung einer Centromersonde für Chromosom 6 (cep6, SG) in Kombination mit der LSI 13 (SO) konnte gezeigt werden, dass die Monosomie für 13q14 in den Imatinib-deprivierten Klonen durch einen Verlust der Sequenz 13q14 am veränderten Chromosom 6 und nicht durch Verlust des intakten Chromosoms 13 zurückzuführen ist (Abb. 22).

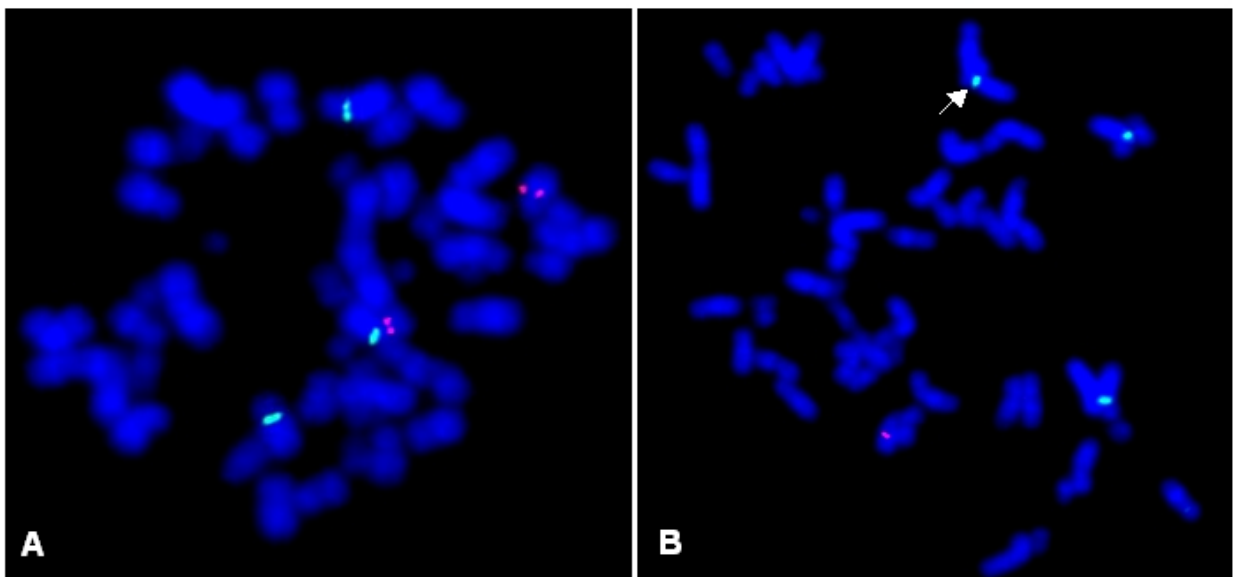


Abb. 22: Repräsentative Metaphaseplatten von Zellen mit einer Disomie (A) und Monosomie für 13q14 (B) mit einer FISH-Markierung für Centromer 6 (cep 6, SG) und LSI13 (SO). Die Zellen mit der Monosomie für 13q14 weisen nur ein Signal für die Targetsequenz am intakten Chromosom 13 auf, am derivativen Chromosom 6 (Pfeil) fehlt die Markierung.

Die Klone mit Monosomie bzw. Disomie für 13q14 konnten durch die Verwendung von semisolidem Medium und einer Selektion mittels Imatinib isoliert werden (vgl. 5.1.3). Die vereinzelt Klone, die in Flüssigmedium weiterkultiviert werden konnten, wurden in regelmäßigen Abständen auf ihre Klonzusammensetzung hin überprüft (s. Tabelle 11, Anhang). In dem Selektionsansatz, der 1  $\mu$ M Imatinib enthielt, konnte bei 6 von 8 Klonen eine Disomie für 13q14 mittels Interphase-FISH nachgewiesen werden, bei der Einzelzellkultivierung ohne Imatinib war das Verhältnis der Klone mit Monosomie 13q14 zu Disomie 13q14 ca. 1:1. Die einzelnen Klone zeigten

dabei eine relativ gute Homogenität von 90-100 %, lediglich bei einem Klon schien es sich um einen Mischklon zu handeln. Von den 18 weiterkultivierten Klonen wurden die Klone 1+, 3+, 4+, 6+ und 7+, sowie 1-, 3-, 4- 10- und 11- für weiterführende Experimente weiterkultiviert, so dass jeweils 5 Klone mit einer Monosomie für 13q14 und 5 Klone mit einer Disomie zur Verfügung standen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Klone auch nach drei Monaten in Kultur noch die spezifischen molekular-zytogenetischen Eigenschaften hinsichtlich der Verteilung von Monosomie oder Disomie 13q14 aufwiesen.

#### 6.2.4 SNP-Array-Analysen

Die isolierten Klone wurden mittels SNP-Arrays von Nicole Posorski (AG Tumorgenetik des Instituts für Humangenetik, Jena) auf kleinere Zugewinne oder Verluste hin untersucht, die mit der M-FISH-Methode nicht erfassbar gewesen wären. Außerdem sollte der Bruchpunkt auf dem Chromosom 13 möglichst genau eingegrenzt werden. Es wurde ein Klon mit einer Monosomie für 13q14 (Klon 4) gegen einen Klon mit einer Disomie für 13q14 (Klon 8) verglichen. Alle chromosomalen Veränderungen, die mittels M-FISH nachgewiesen werden konnten, wurden mit der SNP-Technik bestätigt.

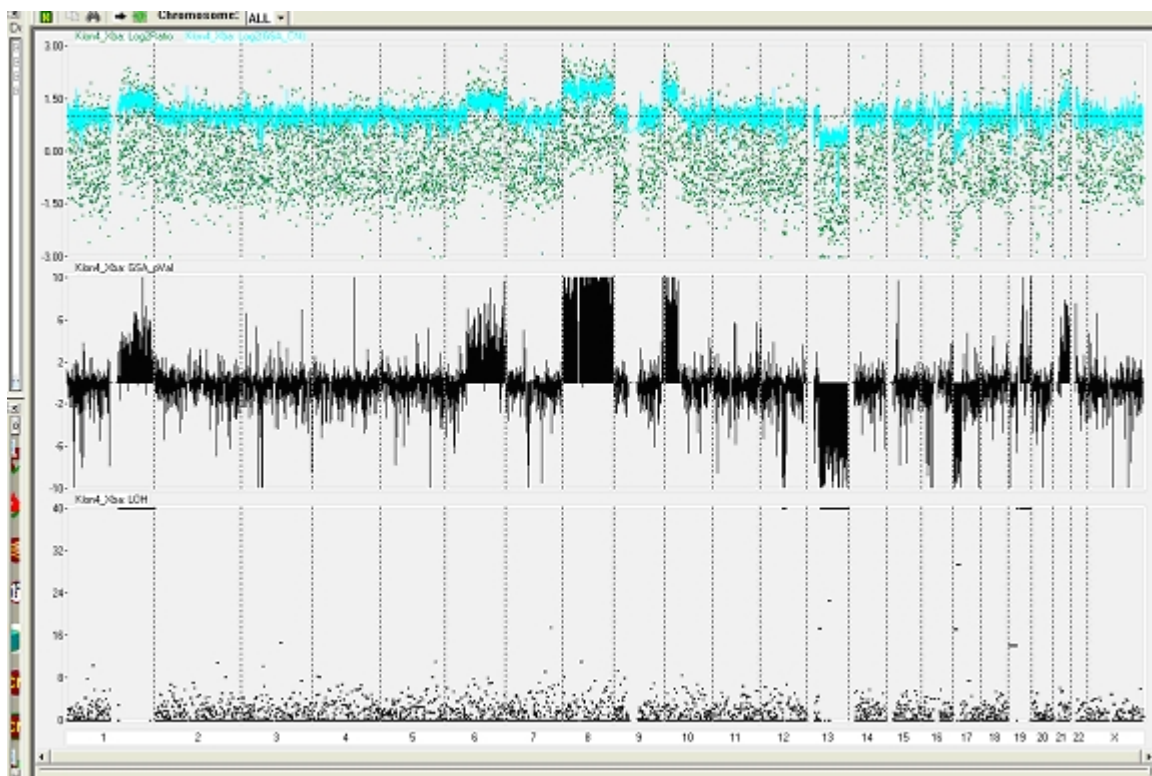


Abb. 23: Gesamtübersicht über alle chromosomalen Veränderungen des Klons 4 von KCL22-R nach SNP-Analyse. Auf der X-Achse sind die Chromosomen von 1-22 sowie X aufgetragen. Im oberen Teil der Abbildung sind Zugewinne und Verluste dargestellt, im unteren Drittel wurden LOH-Ereignisse (*loss-of-heterozygosity*) detektiert. Erklärungen im Text.

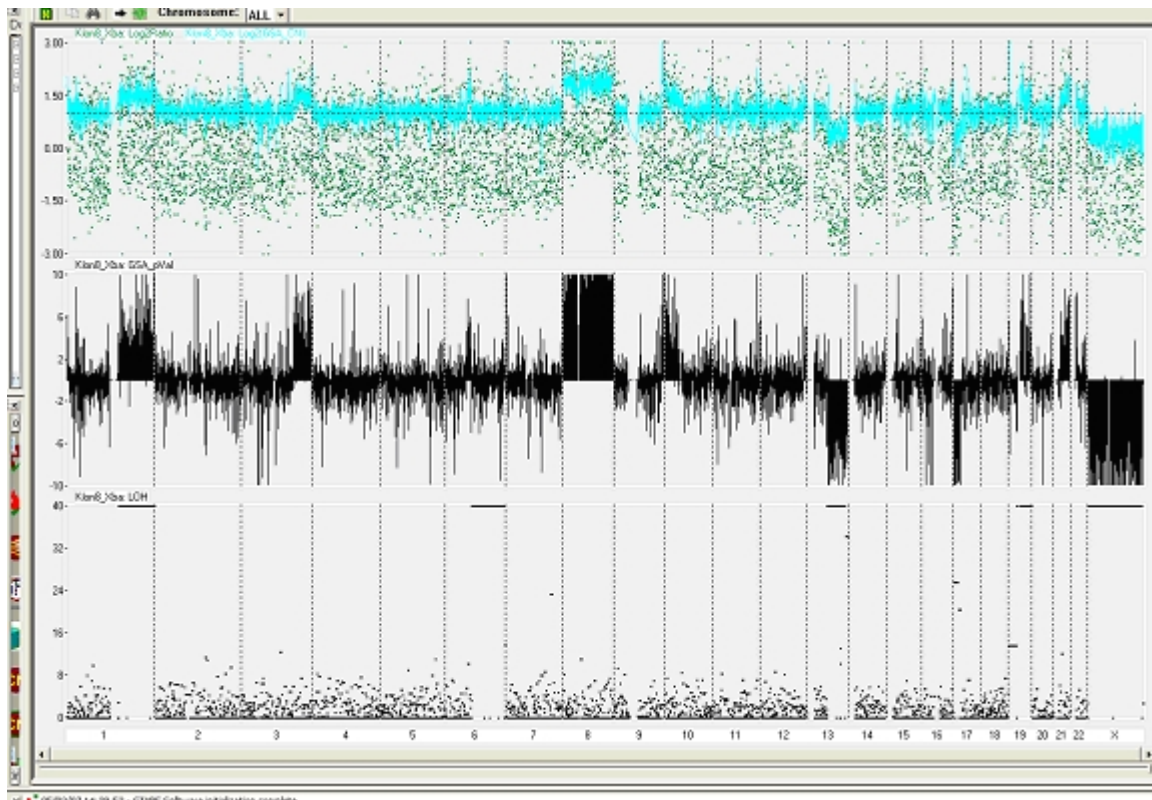


Abb. 24: Gesamtübersicht über alle chromosomalen Veränderungen des Klon 8 nach SNP-Analyse. Für Beschreibung der Achsen s. Abb. 23, Erklärungen im Text.

Für das Chromosom 13 konnte für Klon 4 ein Verlust von 82 MB nachgewiesen werden, der Bruchpunkt wurde in q13.1 lokalisiert, was in einer Monosomie für 13q14 resultiert und die Ergebnisse aus MCB, M-FISH und Interphase-FISH bestätigt. Für den Klon 8 wurde ein Verlust von 60,2 MB nachgewiesen, der Bruchpunkt lag in q21.1, somit lag hier eine Disomie für 13q14 vor. Eine Liste der Gene in dem Bereich findet sich im Anhang, Tabelle 21.

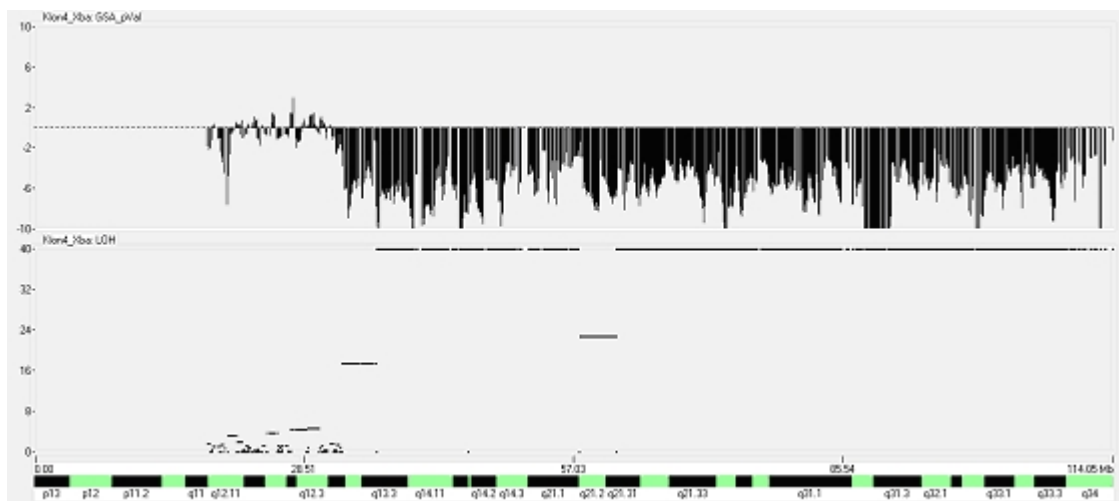


Abb. 25: SNP-Analyse von Chromosom 13. Unten ist der untersuchte Bereich des Chromosoms dargestellt (grün-schwarz), darüber sind Zugewinne und Verluste sowie daraus entstehende LOH dargestellt. Klon 4 wies einen Verlust eines 82 MB großen DNA-Abschnitts beginnend ab 13q13.1 auf, was mit einer Monosomie für 13q14 einhergeht.



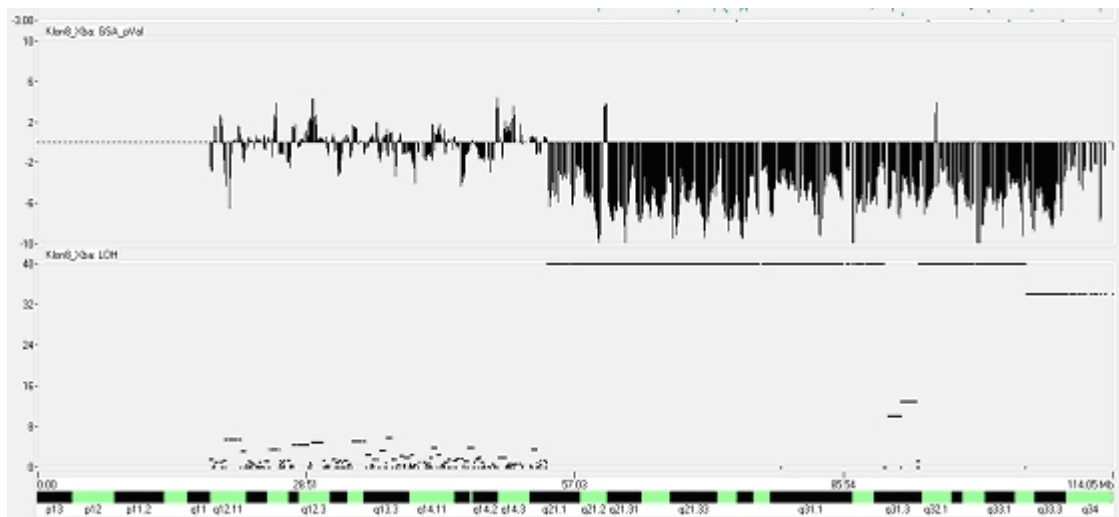


Abb. 26: SNP-Analyse von Chromosom 13. Für Beschreibung der Achsen s. Abb. 26. In Klon 8 konnte ein Verlust von 60,2 MB nachgewiesen werden, Bruchpunkt war hier der Bereich 13q21.1, damit ist dieser Klon für den Bereich 13q14 disom.

### Zusammenfassung

Bei der Analyse auf zytogenetischer Ebene zeigten sich eine Reihe von Unterschieden im Karyogramm der beiden Zelllinien. Insbesondere am Chromosom 6 konnte bei der resistenten Zelllinie eine Translokation von unterschiedlich großen Mengen von 13q12→ter nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass die Zelllinie KCL22-R aus verschiedenen Klonen mit variablem Anteil für 13q14 besteht und dass diese Region bei der Behandlung mit Imatinib eine Rolle spielt. Zellen mit einer Monosomie für diesen Bereich konnten ohne Imatinib-Behandlung besser proliferieren als Zellen mit einer Disomie für 13q14. Die genauere Analyse des fraglichen chromosomalen Abschnittes mittels SNP-Analyse ergab den Verlust eines über 80 MB-großen Fragments mit dem Bruchpunkt in 13q13.1.

## 6.3 Analyse der proteomischen Veränderungen

Die Zellen der resistenten Zelllinie KCL22-R können in Anwesenheit von Imatinib, also auch bei inaktiver BCR-ABL-Tyrosinkinase proliferieren. Die Zellen müssen also eine Möglichkeit gefunden haben, die Funktion der Tyrosinkinase zu ersetzen bzw. zu umgehen. Ein Ansatz, nach solchen Veränderungen zu suchen, besteht in der Analyse der Protein-Expressionsunterschiede zwischen sensibler und resistenter Zelllinie. Ziel war es, Proteine zu finden, die in der resistenten Zelllinie auf einem anderen Expressionsniveau vorhanden sind als in der sensiblen Zelllinie und diese über funktionelle Analysen mit dem resistenten Phänotyp in Zusammenhang zu bringen.

### 6.3.1 Massenspektrometrische Untersuchungen (SELDI)

Durch die Kombination von chromatographischen Oberflächen und der Massenspektrometrie ist es mit der SELDI-Technik möglich, komplexe Proben wie Gesamtzelllysate oder Serumproben ohne vorherige Aufreinigung zu analysieren. Trotzdem verbessert eine Vorfraktionierung das Auflösungsvermögen der Methode erheblich. Daher sind hier nur die Ergebnisse nach Fraktionierung mittels einer Anionenaustauschersäule (QHyperD), die eine Aufreinigung nach dem isoelektrischen Punkt ermöglicht, gezeigt. Die aufgereinigten Fraktionen wurden auf mehreren Chipoberflächen untersucht, jedoch zeigte die Verwendung von Kupfer-beschichteten IMAC-Chips



die besten Ergebnisse. Die Daten wurden mittels der ExPASy-Datenbank (TaqIdent-Tool) durch Eingabe von Molekulargewicht und ungefährem isoelektrischen Punkt analysiert. Die Identifizierung der gefundenen Peaks mittels Peptide Mass Fingerprint (PMF) war jedoch aufgrund der geringen Größe und Proteinkonzentration kaum möglich, auch durch die Verwendung von Peptid-Gelen (112) konnten keine Verbesserungen bei der Identifizierung erzielt werden. Daher stellen die Datenbankrecherchen nur Anhaltspunkte dar. Es wurden 45 Peaks als charakteristisch unterschiedlich für die Spektren der beiden Zelllinien ermittelt (Tabelle 5). Die meisten Signale konnten in der F1-Fraktion (Proteine mit einem  $pI > 9$ ) ermittelt werden, die wenigsten wurden in der Fraktion detektiert, die mit organischem Lösungsmittel von der Säule eluiert wurden.

**Tabelle 5: SELDI-Peaks in den verschiedenen pI-Fractionen (F) nach Analyse auf IMAC-Kupfer**

Fraktion	MG (kDa)	p-value	AUC	X-fache Überexpression	S/R	Fraktion	MG (kDa)	p-value	AUC	X-fache Überexpression	S/R
F1 (pH 9)	3673	0,0017	0,88	7,40	S	F4 (pH 4)	6074	0,007	0,82	5,60	S
	4225	0,005	0,87	2,80	R		7964	0,002	0,9	3,60	R
	4559	0,002	0,89	3,90	R		8617	0,008	0,81	1,70	R
	5444	0,003	0,85	7,20	S		17432	0,002	0,81	1,50	R
	5468	0,0007	0,91	12,13	S		17921	0,047	0,71	1,59	R
	5541	0,01	0,79	9,40	S		27251	0,013	0,77	1,50	S
	6235	0,0004	0,72	3,00	R		33167	0,035	0,8	1,52	R
	7482	0,0009	0,89	6,30	R		54324	0,047	0,74	1,40	R
	9352	0,002	0,87	2,30	R		73867	0,013	0,75	5,50	R
	9708	0,0007	0,9	4,50	R		106852	0,03	0,81	1,80	S
	10380	0,0081	0,81	2,90	R	F5 (pH 3)	7820	0,03	0,84	2,50	S
	11307	0,002	0,77	1,50	S		11144	0,035	0,75	1,90	R
	11583	0,006	0,82	1,40	S		11234	0,017	0,78	1,89	R
	25179	0,02	0,77	1,28	R		11268	0,02	0,75	1,86	R
	25522	0,02	0,77	1,42	R		11312	0,04	0,75	1,47	R
	54212	0,03	0,77	1,33	R		15926	0,02	0,81	1,56	R
	67376	0,02	0,77	2,20	S		19049	0,03	0,8	1,90	S
	78870	0,04	0,77	1,87	S	F6 (organisch)	15065	0,02	0,82	2,02	R
F2 (pH 7)	4088	0,002	0,94	5,20	R		31728	0,045	0,72	1,50	R
	54214	0,0017	0,93	2,89	R						
F3 (pH 5)	6061	0,002	0,87	8,70	S						
	12260	0,03	0,77	3,60	R						
	12438	0,02	0,77	2,18	R						
	12507	0,0004	0,94	1,60	R						
	13336	0,03	0,77	2,01	R						
	17202	0,02	0,81	1,74	R						

AUC = Area Under Curve, s. auch Statistik (5.5), S/R = in welcher Probe als überexprimiert detektiert

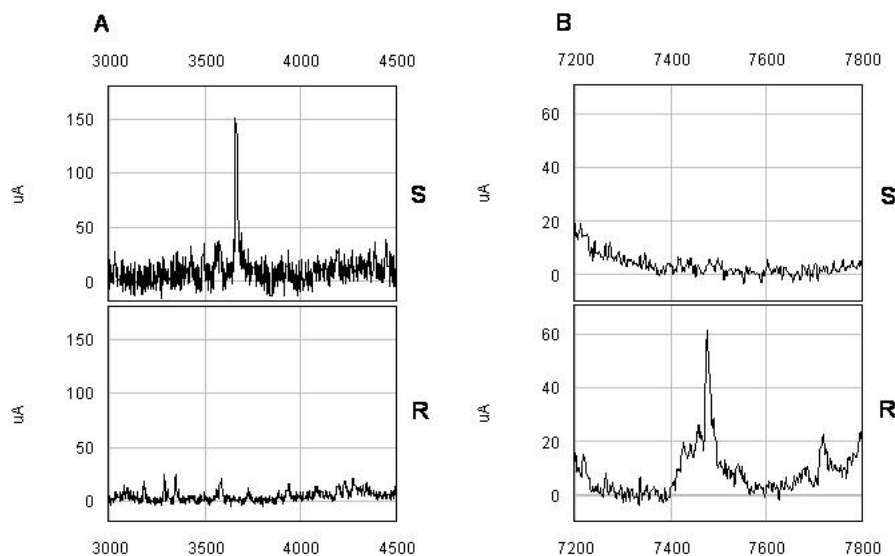


Abb. 27: Repräsentatives SELDI-Spektrum zweier differentiell exprimierter Peaks. (A) Protein oder Peptid mit ca. 3673 Da, in KCL22-S ca. 7-fach höher exprimiert als in KCL22-R. (B) Protein oder Peptid mit ca. 7482 Da, in KCL22-R ca. 6-fach höher exprimiert als in KCL22-S.

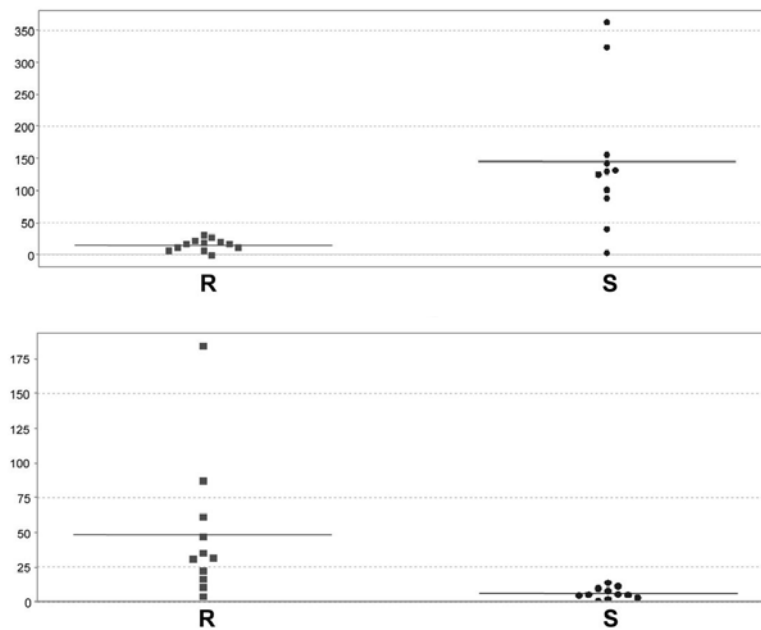


Abb. 28: Darstellung der Expressionsunterschiede mittels ClusterBlot-Analyse. Oben: Verteilung der Expression des Proteins mit 3673 Da in den 11 biologischen Replikaten. Unten: Verteilung der Expression des Proteins mit 7482 Da in den 11 biologischen Replikaten.

Exemplarisch sind die Expressionsprofile von zwei Proteinen bzw. Peptiden als Spektrum und als Cluster Blot dargestellt (Abb. 27, Abb. 28). Für die sensitive Zelllinie konnte ein Peak aus der F1-Fraktion mit einem Molekulargewicht von ca. 3673 Da als besonders charakteristisch ermittelt werden. Der Peak hatte in der KCL22-S durchschnittlich eine 7,4-fach höhere Intensität als in KCL22-R. Die Datenbankrecherche für diesen Peak mittels TaqIdent ergab bei folgender Eingabe: pI min.: 9, max.: 12, MG: 3673 Da, Abweichung 1 % zwei Treffer:

- Neuromedin B-32, pI 11,54, MG 3674 Expasy-Nr. P08949
- Prolactin-releasing peptide, pI 11,71, MG 3665, Expasy-Nr. P81277

Für die resistente Zelllinie war ein Peak mit einem Molekulargewicht von ca. 7482 Da signifikant. Der Peak, der ebenfalls in der F1-Fraktion gemessen wurde, hatte in der KCL22-R durchschnittlich eine 6,3fach höhere Intensität als in KCL22-S. Die Datenbankrecherche für diesen Peak mittels TaqIdent ergab bei folgender Eingabe: pI min.: 9, max.: 12, MG: 7482 Da, Abweichung 1 % mehrere Treffer, unter anderem einige Wachstumsfaktoren, die auch als Lymphom-assoziert beschrieben wurden:

- MDC, pI 9,1, MG 7531 Expasy-Nr. O00626
- TCI, pI 9,06, MG 7442, Expasy-Nr. P0775

In einer früheren Untersuchung wurde in der resistenten Zelllinie für diesen Peak unter weniger stringenten Suchbedingungen noch ein anderes Protein über die Datenbankrecherche als Kandidat ermittelt:

- RAB7B, pI 6,95, MG 7450, Expasy-Nr. Q96IM5

Durch den Zusammenhang mit dem MAPK-Signalweg erschien dieser Kandidat besonders interessant. Da kein Antikörper erhältlich war, wurde eine Analyse der Expression des Proteins auf mRNA-Ebene durchgeführt. Es wurde deutlich, dass RAB7B auf m-RNA-Ebene in der unbehandelten sensitiven Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten resistenten Zelllinie nur sehr schwach exprimiert ist (RAB7B zu G6PDH 0,002 in KCL22-S zu 0,148 in KCL22-R, Abb. 29). Nach der Delta-Delta-Ct-Methode (s. 5.3.3) ergab sich für die unbehandelten Proben ein Expressionsunterschied von durchschnittlich 87-fach (s. Tabelle 9). Nach Zugabe von 1  $\mu$ M

Imatinib für 24 h stieg die Expression von RAB7B auch in der sensitiven Zelllinie an, die Expression erhöhte sich um den Faktor 50. Trotzdem war der Unterschied zur resistenten Zelllinie mit einem Faktor von 13 immer noch sehr stark.

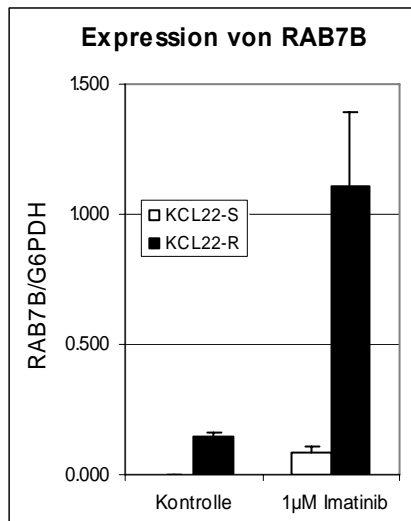


Abb. 29: Relative Expression von RAB7B zum Referenzgen G6PDH in den Zelllinien KCL22-S und -R mit und ohne Imatinib-Behandlung. Die resistente Zelllinie zeigte sowohl in der Kontrollprobe als auch nach Behandlung mit 1  $\mu$ M ein deutlich höheres Expressionsniveau als die sensitive Zelllinie.

Um zu untersuchen, ob die Expression von RAB7B in Zusammenhang mit der Imatinib-Resistenz *in vivo* steht, wurde die cDNA von 46 Patienten untersucht, die hinsichtlich ihrem Ansprechen auf Imatinib charakterisiert waren. Die Patientenproben wurden freundlicherweise von Dr. Peter Häusler, Oncoscreen, zur Verfügung gestellt. Es konnte jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen sogenannten Non-Respondern und einer erhöhten RAB7B-Expression gestellt werden. Ebenso gab es keinen Unterschied im Expressionsniveau von RAB7B bei Imatinib-behandelten und unbehandelten Patienten (Daten s. Tabelle 10, Anhang).

### 6.3.2 Aufreinigung nach isoelektrischem Punkt und eindimensionale Gelelektrophorese (1DE)

Die für die massenspektrometrische Analyse aufgereinigten Proben wurden mittels 1DE weiter separiert und die Proteine durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Banden, die sich im Gelspektrum von sensibler und resistenter Zelllinie unterschieden, wurden ausgeschnitten und per PMF identifiziert. Es konnten 20 Proteine identifiziert werden, jedoch erwies es sich mit dieser Technik als schwierig, tatsächliche Expressionsunterschiede sichtbar zu machen, da die Proteinkonzentrationen nach der Fraktionierung schwer mess- und einstellbar waren. Daher wurde auf eine Verifizierung der Kandidaten mittels immunologischer Methoden verzichtet. Es wurden allerdings Proteine als differentiell exprimiert identifiziert, die auch nach Analyse mit 2DE Unterschiede zeigen. Zu nennen ist hier vor allem die Enolase (überexprimiert in KCL22-S), die Carbonic Anhydrase (überexprimiert in KCL22-R), hnRNP A2/B1 (KCL22-R) und ein SH3-Domänen-bindendes Protein (KCL22-R). Für die Enolase wurden die verschiedenen Isoformen  $\alpha$  (mittels 2DE) und  $\gamma$  (mittels 1DE) identifiziert. Außerdem wurde eine mutierte Form von  $\beta$ -Aktin in der sensitiven Zelllinie als überexprimiert identifiziert. Dieses Protein wurde durch Co-Immunopräzipitation als Interaktionspartner von B-Raf gefunden (Ignacio Rubio, unveröffentlichte Daten).

Exemplarisch für einen Versuch ist ein Gelbild (Abb. 30, 12 %iges Bis-Tris-Gel, Färbung Coomassie) mit Banden, für die Kandidaten ermittelt werden konnten, dargestellt. Die vollständige Liste aller identifizierten Banden findet sich im Anhang (s. Tabelle 12).

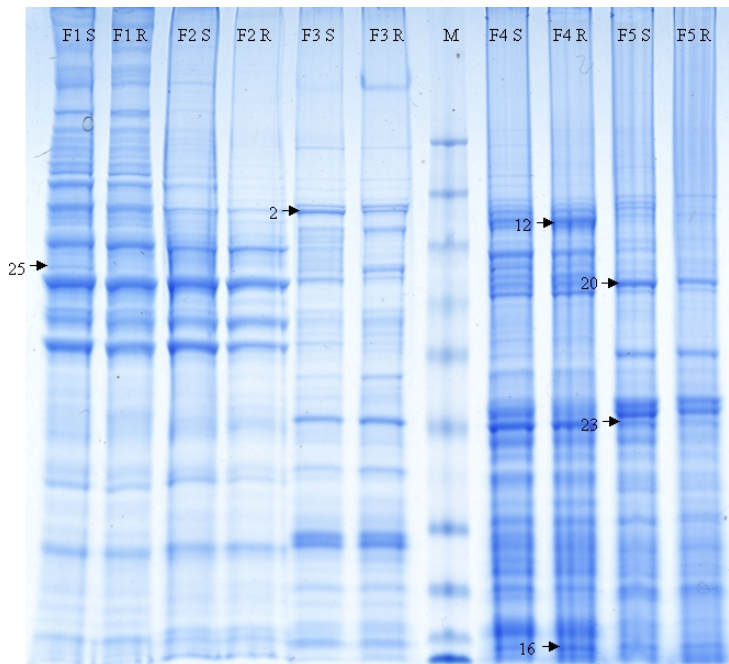


Abb. 30: Repräsentatives Gelbild der fraktionierten Proben mit Banden, für die Kandidaten identifiziert werden konnten, Liste s. Anhang, Tab. 12.

### 6.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)

Die vergleichende Analyse von Gesamtzelllysaten der sensitiven und der resistenten Zelllinien mit 2DE, Coomassiefärbung und PMF ergab 55 differentiell exprimierte Proteine. Eine vollständige Liste findet sich im Anhang (s. Tabelle 13). Besonders interessant erscheinen die Heat-Shock-Proteine HSP27 und HSP70, Vimentin, Enolase und das hnRNP A2/B1, die jeweils mehrfach identifiziert werden konnten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Liste der häufig mittels 2DE identifizierten differentiell exprimierten Proteine

Name	Swiss-Prot. ID	S/R	Score	Peptide	MG (kDa)
Vimentin	P08670	S	2.43	14/19	53.63
HSP 27	P04792	S	2.09		22.8
HSP 70	P38646	R	2.34	8/13	73.71
Enolase	P06733	S	2.42	11/18	47.15
hnRNP A2/B1	P22626	R	2.43	6/10	35.99

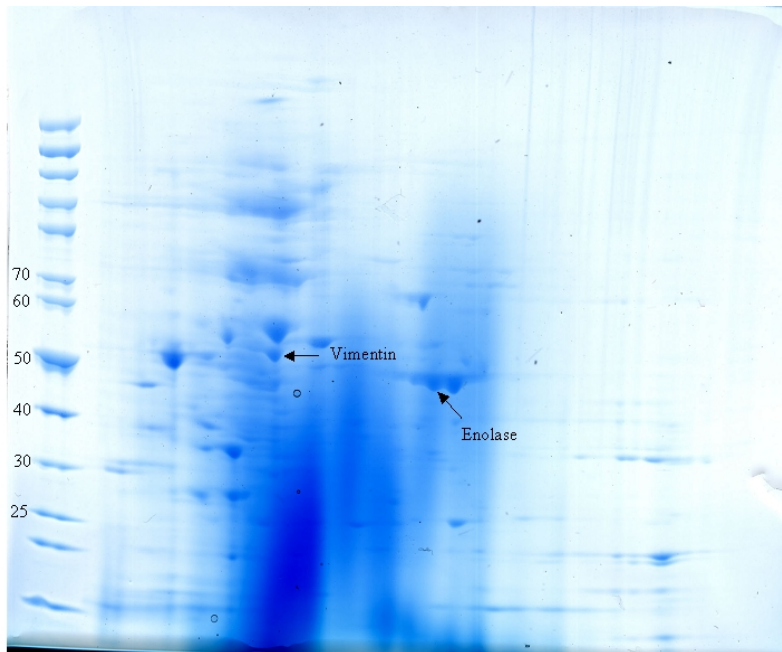


Abb. 31: 2DE von KCL22-S, zwei identifizierte differentiell exprimierte Proteine sind mit Pfeilen markiert.

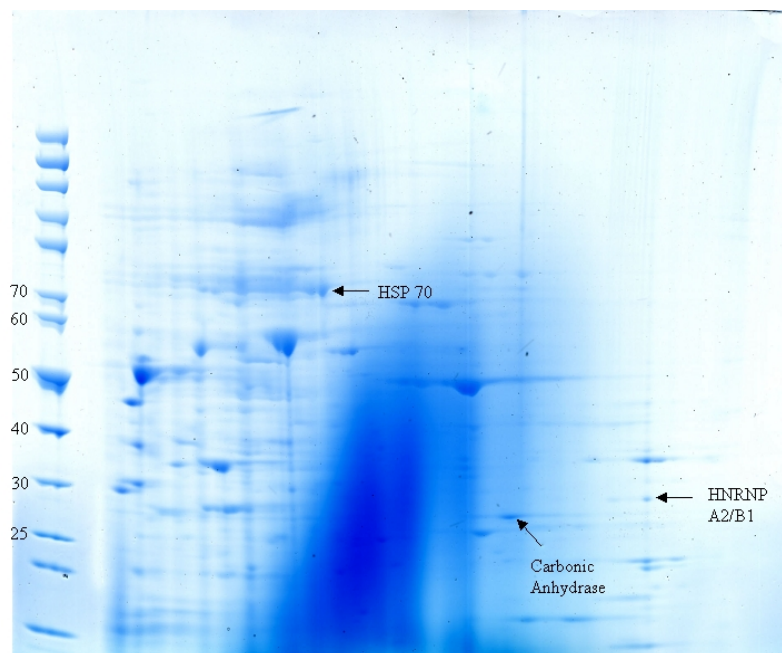


Abb. 32: 2DE von KCL22-R, drei identifizierte differentiell exprimierte Proteine sind mit Pfeilen markiert.

#### 6.3.4 Verifizierung der identifizierten Proteine mittels Western Blot

Mittels Western Blot-Analyse konnten die Ergebnisse aus den Peptidverdauen für HSP27 und Vimentin bestätigt werden. HSP27 ist in den sensitiven Zellen stärker exprimiert. Nach Imatinibtherapie (1  $\mu$ M) sinkt die Expression in den sensitiven Zellen ab, liegt aber immer noch über dem Level der resistenten, bei denen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen kaum ein Unterschied nachweisbar war (s. Abb. 33). Die Expression von Vimentin ist in den sensitiven Zellen deutlich erhöht, die Abhängigkeit zur Imatinibtherapie wurde hier nicht untersucht (s. Abb. 34). Für die Enolase wurden mittels Western Blot gegenteilige Ergebnisse im Vergleich zur 2DE-Analyse erzielt. Die Enolase ist laut 2DE-Experiment in den sensitiven Zellen stärker exprimiert. Western Blot-Untersuchungen konnten ein ca. zwei- bis dreifach erhöhtes Expressionsniveau in den

resistenten Zellen gegenüber den sensitiven zeigen (s. Abb. 35). Außerdem nimmt die Expression der Enolase mit steigender Imatinib-Konzentration zu.

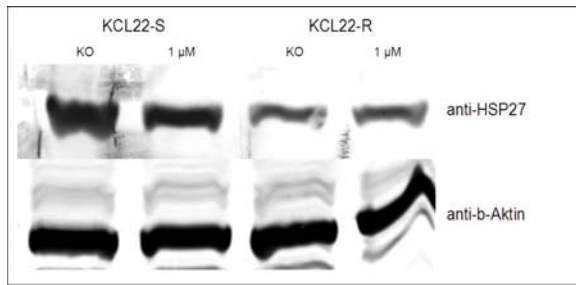


Abb. 33: Bestätigung der differentiellen Expression von HSP27 in KCL22-S. Nach Imatinibgabe (1  $\mu$ M) sinkt das Expressionsniveau deutlich.

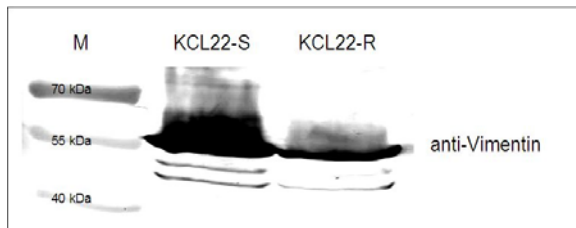


Abb. 34: Vimentin ist in der sensitiven Zelllinie deutlich stärker exprimiert als in der resistenten. Ein Zusammenhang mit der Imatinib-Therapie wurde hier nicht untersucht.

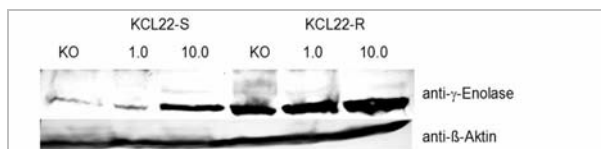


Abb. 35: Die Enolase ist in den resistenten Zellen stärker exprimiert als in den sensitiven. Mit steigenden Imatinib-Konzentrationen (IM, 1-10  $\mu$ M) nimmt auch die Expression der Enolase zu.

## Zusammenfassung

Das Protein Profiling mittels SELDI-Technologie ergab 45 signifikant verschiedene Peaks. Über ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese und PMF konnten 20 bzw. 55 differentiell exprimierte Proteine identifiziert und zwei mit immunologischen Methoden bestätigt und eins korrigiert werden. Bei dem Kandidaten RAB7B erfolgte die Bestätigung mittels quantitativer PCR, da kein Antikörper erhältlich war. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in KCL22-R 87-fach stärker exprimiert ist und die Expression Imatinib-abhängig ist.

## 6.4 Analyse der BCR-ABL-assoziierten Signalwege

Nicht nur Unterschiede in der Proteinexpression sondern auch in der Proteinaktivität könnten bei der Entstehung der Imatinib-Resistenz eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, dass die BCR-ABL-Kinase in der resistenten Zelllinie durch die dauerhafte Aktivität einer anderen Kinase übernommen wird oder dass eine Phosphatase, die Proteine inaktivieren kann, in der KCL22-R dereguliert ist. Um solche Phänomene zu untersuchen, wurden Signalwege untersucht, die im Zusammenhang mit BCR-ABL stehen (2.1). Es sollte untersucht werden, welche Signalwege für die resistente Zelllinie zum Überleben wichtig sind und ob die Blockierung eines Signalweges in Kombination mit der Inhibition der BCR-ABL-Kinase das Wachstum der resistenten Zellen verhindern kann.

### 6.4.1 Untersuchung des MAPK-Signalweges

Veränderungen in dem MAPK-Signalweg stellen bei vielen malignen Erkrankungen die Ursache für die unkontrollierte Zellproliferation dar. Zudem lagen durch die Analyse des Proteinexpressionsprofils bereits einige Hinweise vor, dass Ras-assoziierte Proteine wie z.B. RAB7B in der resistenten Zelllinie vor allem im Kontext mit der Imatinib-Behandlung eine Rolle spielen (s. 6.3.1). Daher wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Jana Schiefner eine Versuchsreihe mit verschiedenen MEK-Inhibitoren (U0126, PD98,059) durchgeführt, um die Bedeutung des MAPK-Signalweges für die Imatinib-Resistenz zu klären. Diese wirkten jedoch sehr unspezifisch und mussten in hohen Konzentrationen verwendet werden, daher waren die Ergebnisse schwer zu reproduzieren. Erst durch verbesserte Versuchsbedingungen und Analysemethoden sowie durch die Verwendung des sehr spezifischen Mek-Inhibitors CI-1040, auch als PD184352 beschrieben (Pfizer), konnten die postulierten Effekte nachgewiesen werden. Die ausgesäten Zellen (ca.  $1\text{--}2 \times 10^6$  Zellen/ml in einem 3 ml-Gesamtansatz) wurden mit einer Kombination von  $0,1 \mu\text{M}$  CI-1040 und  $1 \mu\text{M}$  Imatinib über gut eine Woche behandelt. Die Proliferation wurde täglich mit Hilfe der CASY-Technologie und durch die Bestimmung der ATP-Menge in den Zellen analysiert. Medium und Inhibitoren wurden täglich frisch zu den Zellen gegeben, da der Mek-Inhibitor nur für begrenzte Zeit stabil ist. Es konnte gezeigt werden, dass CI-1040 allein weder bei KCL22-S noch KCL22-R einen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Die Imatinib-Gabe führte bei der sensitiven Zelllinie zum Proliferationsstop. Bereits nach zwei Tagen konnte die Proliferation auf 59 % reduziert werden, zu Versuchsende lag die Zellzahl der Imatinib-behandelten Zellen unter 1 % im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Kombinationstherapie mit Imatinib und C-1040 konnte der antiproliferative Effekt von Imatinib nur noch geringfügig gesteigert werden (s. Abb. 36). Auf das Wachstum der resistenten Zelllinie hatte Imatinib keinen Einfluss, zu Versuchsende konnte sogar ein leicht positiver Effekt von Imatinib gemessen werden (+12 %). Erst durch die Kombination von CI-1040 und Imatinib gelang es, das Wachstum der resistenten Zellen effektiv zu hemmen. Hier konnte schon nach 2 Tagen eine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, am achten Tag erreichten die mit Imatinib und CI-1040 behandelten Zellen lediglich 20 % der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 14, Anhang und Abb. 37).

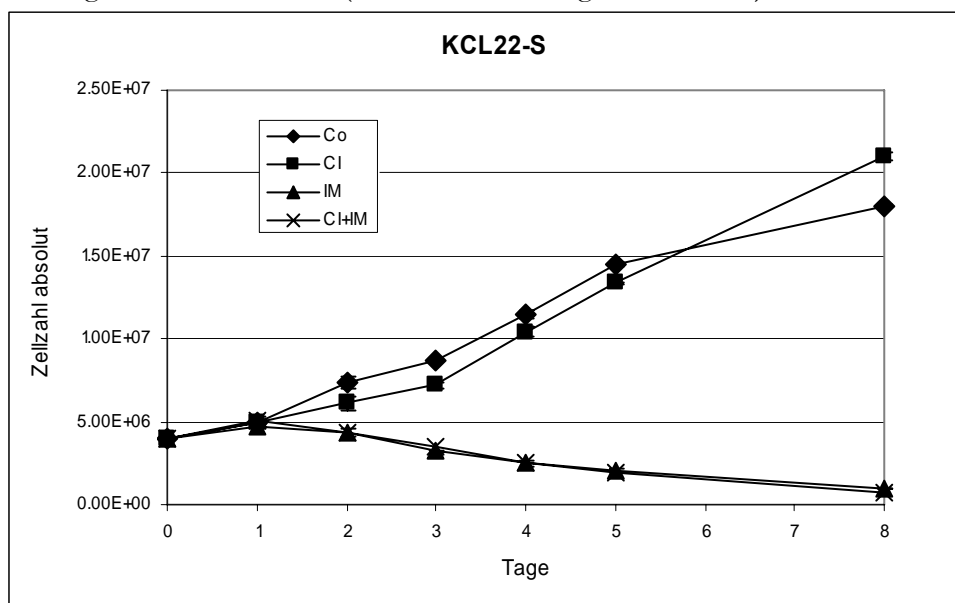


Abb. 36: Zellproliferation nach Kombinationstherapie mit  $0,1 \mu\text{M}$  CI-1040 und  $1 \mu\text{M}$  Imatinib. Die sensitive Zelllinie zeigte keine Reaktion auf CI-1040 allein (CI), jedoch bei Imatinib-Gabe (IM) und der Kombination von CI-1040 und Imatinib (CI/IM) konnten die Zellen nicht mehr wachsen.

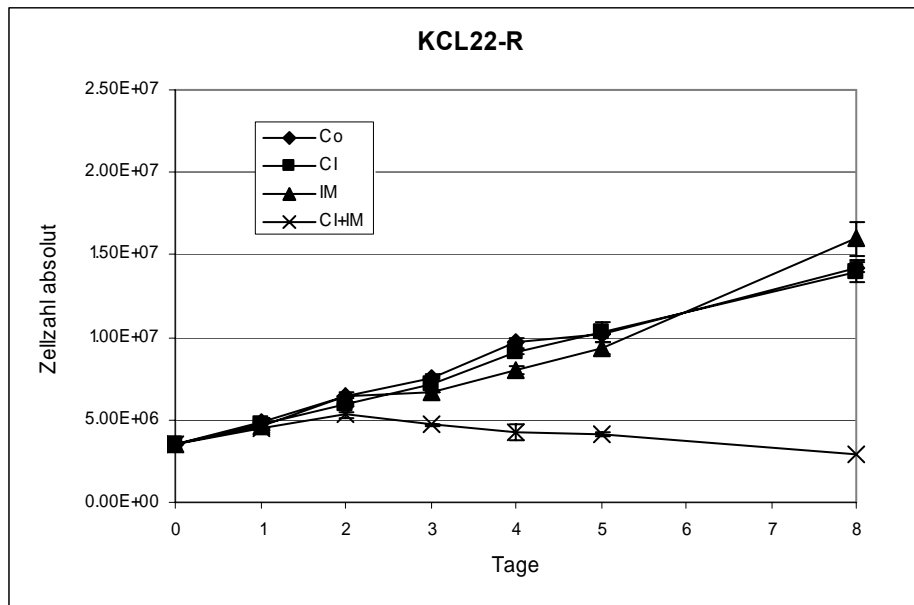


Abb. 37: Zellproliferation nach Kombinationstherapie mit 0,1 µM CI-1040 und 1 µM Imatinib. Die resistente Zelllinie zeigte nur bei der Kombinationstherapie (CI/IM) einen Proliferationsstop im Vergleich zur Kontrolle (Co).

Um zu überprüfen, ob die Zellen durch die Kombinationstherapie in Apoptose gehen oder lediglich ein Proliferationsstop (evtl. durch G1-Arrest) zum verminderten Wachstum führt, wurde die Caspase3/7-Aktivität als ein Indikator für Apoptose analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Imatinib allein bei der sensitiven Zelllinie zu einer über 50 %igen Erhöhung der Apoptose führt (Tabelle 15, Anhang und Abb. 38). Durch die Kombination von Imatinib mit CI-1040 konnte die Apoptoserate sogar verdoppelt werden. Bei der resistenten Zelllinie zeigte sich nach Imatinib-Gabe sogar eine geringfügige Abnahme der Apoptose, die sich auch bei der kombinierten Behandlung zeigte. Die verringerte Zellzahl in KCL22-R wurde also nicht durch Apoptose verursacht.

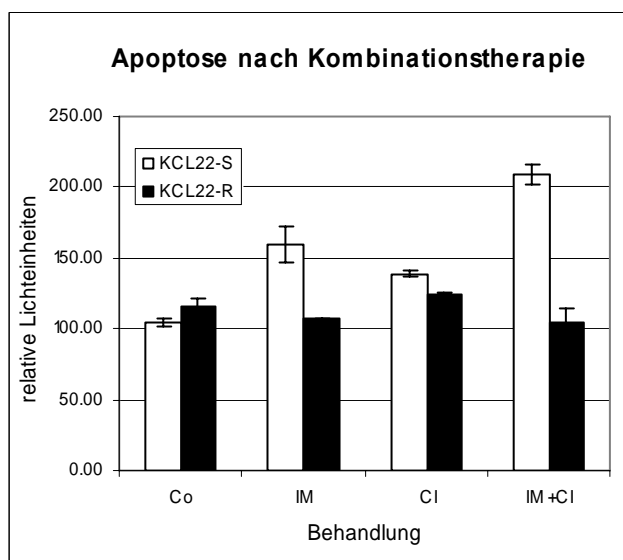


Abb. 38: Caspase3/7-Aktivität der Zellen der sensitiven und der resistenten Zelllinie nach Behandlung mit Imatinib (IM) und CI-1040 (CI) sowie in Kombination (IM+CI). Die Apoptoserate der resistenten Zelllinie bleibt bei allen Ansätzen unbeeinflusst, während die sensitiven Zellen einen Anstieg der Apoptose zeigen, am stärksten bei der Kombinationstherapie.

Die gleichzeitige Blockierung des MAPK-Signalweges und BCR-ABL resultiert in einem Proliferationsstop bei der resistenten Zelllinie, der MAPK-Signalweg scheint also eine wichtige Rolle für die Proliferation der Zelllinie KCL22-R zu spielen. Im Anschluss an die Proliferations-



experimente wurden nun die Aktivitätsmuster der Mitglieder des MAPK-Signalweges auf mögliche Veränderungen, z.B. eine konstitutive Aktivierung, untersucht. Besonders Ras ist durch Mutationen in seiner Aktivität verändert und bei vielen Tumorarten Ursache für die ungehemmte Proliferation der Krebszellen (99). Die Analyse der Ras-Aktivität mittels RBD-Pulldown-Assay ergab jedoch keine gravierenden Unterschiede zwischen sensibler und resistenter Zelllinie. Die Behandlung mit Imatinib führte bei beiden Zelllinien zu einer Abnahme der Menge an aktivem Ras, bei der resistenten Zelllinie jedoch unvollständig (Abb. 39). Eine Mutation im Ras-Gen kann somit als Ursache für die Imatinib-Resistenz ausgeschlossen werden.

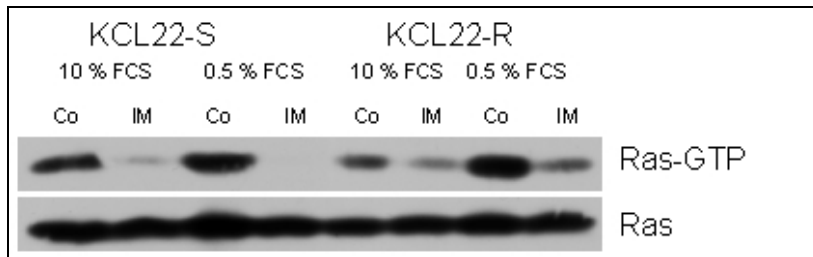


Abb. 39: Nachweis von aktivem Ras, die Mengen sind bei beiden Zelllinien vergleichbar. Als Referenz wurde Gesamt-Ras verwendet, die verwendeten Proteinmengen schwanken nur wenig. Co = Kontrolle, IM = mit 1  $\mu$ M Imatinib behandelt

Eine Untersuchung der Kinase-Aktivität der unterhalb von Ras wirkenden Serin-Threonin-Kinasen von B-Raf und C-Raf zeigte deutlich ein verändertes Aktivitätsmuster beider Proteine nach Imatinib-Behandlung in der resistenten Zelllinie. Während bei KCL22-S bereits 0,1  $\mu$ M Imatinib ausreichen, um die Kinase-Aktivität zu reduzieren, nimmt sie bei der resistenten Zelllinie mit steigender Imatinib-Konzentration sogar noch zu (Abb. 40 und Abb. 41). Besonders deutlich wurden diese Veränderungen bei C-Raf beobachtet. Auch B-Raf zeigte diese Tendenzen, jedoch mit höheren Standardabweichungen (Daten sind nicht gezeigt).

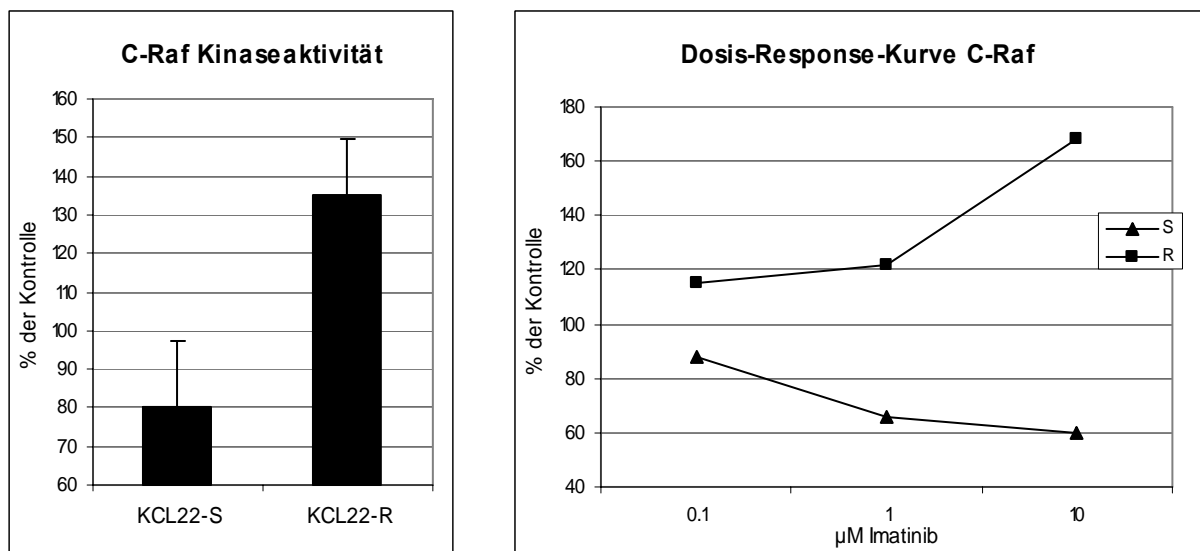


Abb. 40 links: Durchschnittliche Kinaseaktivität von C-Raf in Gegenwart von 1  $\mu$ M Imatinib in sensibler und resistenter Zelllinie. Rechts: Abhängigkeit der Kinaseaktivität von der Imatinib-Konzentration im Versuchsansatz. Die Kinaseaktivität von C-Raf reduziert sich in der KCL22-S auf 60 %, während die Zellen der resistenten Zelllinie einen Anstieg der Kinaseaktivität nach Imatinib-Gabe zeigen.

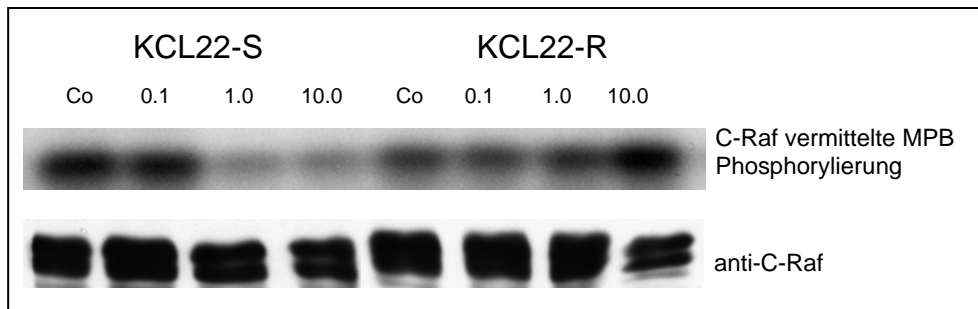


Abb. 41: C-Raf-vermittelte Phosphorylierung des Substrats MBP, sichtbar gemacht durch den Einbau von radioaktivem ATP ( $[\gamma^{35}\text{-P}]\text{-ATP}$ ). Imatinib blockiert bei KCL22-S bereits bei 1  $\mu\text{M}$  die C-Raf-Aktivität, während bei KCL22-R die C-Raf-Aktivität bei zunehmender Imatinib-Dosis sogar noch steigt. Im unteren Teil der Abbildung findet sich der Western Blot gegen C-Raf den selben Proben, um zu zeigen, dass identische Proteinmengen für das Kinase-Assay verwendet wurden.

Diese konstitutive Aktivierung lässt sich auch für Erk nachweisen (Abb. 42). Zudem konnte gezeigt werden, dass schon die Basis-Erk-Aktivität in der resistenten Zelllinie höher ist als in der sensitiven. Durch die Behandlung mit Imatinib lässt sich die Phosphorylierung von Erk in der sensitiven Zelllinie unterbinden, in der resistenten jedoch nicht. Die Verwendung des Mek-Inhibitors CI-1040 führt sowohl bei KCL22-S als auch bei -R zu einer Verringerung bzw. vollständiger Blockierung der Erk-Aktivität. In der resistenten Zelllinie bleibt, möglicherweise aufgrund der höheren Grundaktivität bei dem Einsatz gleicher Inhibitorkonzentrationen eine Restaktivität.

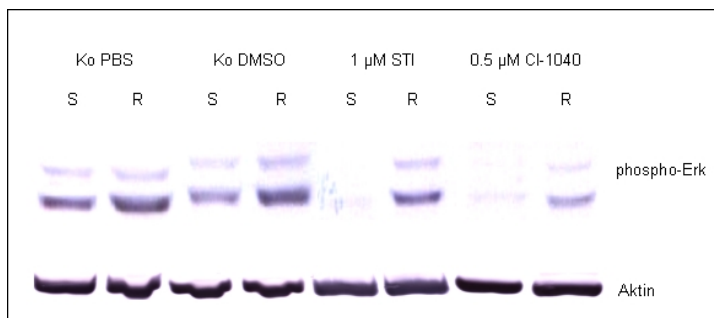


Abb. 42: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Erk (Western Blot gegen Phospho-Erk). Die resistenten Zellen zeigten eine deutlich höhere Konzentration an phosphoryliertem Erk als die sensitiven Zellen. Die Behandlung mit Imatinib führte bei KCL22R nicht zur Löschung dieser Phosphorylierung.

Eine mögliche Ursache für die konstitutive Aktivierung von Raf können Mutationen in der Kinasedomäne oder in regulatorischen Domänen sein. Für B-Raf sind bereits konstitutiv aktivierende Mutationen in einigen Exons bekannt (99; 113), für C-Raf oder das dritte Mitglied der Raf-Familie, A-Raf (welches in Leukozyten nicht exprimiert wird), jedoch nicht. Die *hot spot*-Regionen von B-Raf und die homologen Regionen von C-Raf wurden daher mittels Sequenzierung im Rahmen der Diplomarbeit von Melanie Eberhard nach Mutationen untersucht. Es konnten keine Veränderungen in der DNA-Sequenz der untersuchten Exons nachgewiesen werden (Daten s. Anhang 13). Somit können Raf-Mutationen als Ursache der konstitutiven Aktivierung ausgeschlossen werden. Auch die Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene von B-Raf, C-Raf und Erk unterscheiden sich bei den beiden Zelllinien kaum (Tabelle 16, Anhang und Abb. 43).

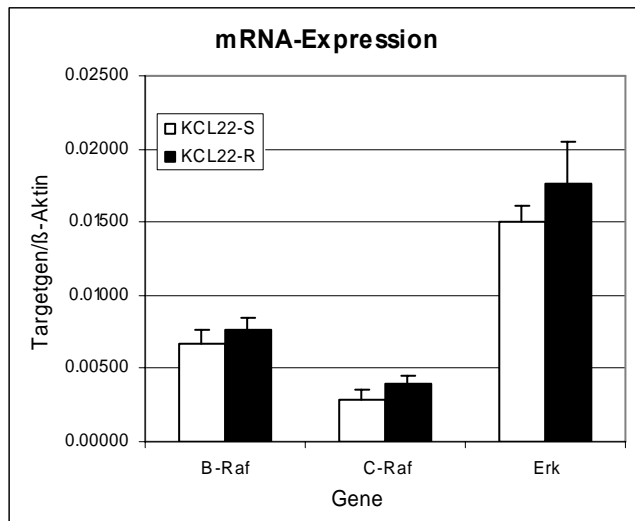


Abb. 43: mRNA-Expressionsniveau von B-Raf, C-Raf und Erk. Alle drei Kinasen waren in der resistenten Zelllinie nur geringfügig stärker exprimiert als in der sensitiven Zelllinie.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Interaktionspartner-Analyse mittels Co-Immunopräzipitation, um mögliche neue bzw. in ihrer Aktivität veränderte Regulatoren der Raf-Kinasen zu finden. Die Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Melanie Eberhard durchgeführt. Es wurden verschiedene Matrices wie Protein-G-Sepharose aber auch magnetische MicroBeads verwendet, die eine bessere Aufreinigung erlauben. Zudem wurden auch kovalent an die Matrix gebundene Antikörper verwendet, um zu vermeiden, dass Teile der Antikörper störend auf die Auswertung mittels Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie wirken. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine mit Coomassie- oder Silberfärbung sichtbar gemacht und differenzierende Banden ausgestochen. Nach tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse konnten fünf Interaktionspartner von B-Raf und C-Raf identifiziert werden (s. Tabelle 7). Vimentin konnte mit einem Z-Wert von 2,31, was einer Wahrscheinlichkeit von ca. 99 % entspricht, als Interaktionspartner von C-Raf, jedoch nicht von B-Raf identifiziert werden. HSP90 wurde mit einer ähnlich hohen Wahrscheinlichkeit als Interaktionspartner von C-Raf bestimmt. Die Ergebnisse für Vimentin und HSP 90 konnten mittels Western Blot bestätigt werden (Abb. 44). Für den ermittelten Interaktionspartner Carbamylphosphatase-Synthetase war kein Antikörper kommerziell erhältlich, daher war eine Validierung mit immunologischen Methoden nicht möglich. Diese Interaktion mit den Raf-Kinasen wurde allerdings sehr häufig mit hoher Bewertungswahrscheinlichkeit laut Datenbankanalyse gefunden und kann somit als relativ sicher angesehen werden. Als weitere Interaktionspartner wurden unter anderem Myosin und PI3-Kinase ermittelt.

**Tabelle 7: Identifizierte Interaktionspartner von B-Raf und C-Raf**

Name	SwissProt-ID	MG [kDa]	pI	übereinstimmende Peptide	Z-Score	Wahrscheinlichkeit in %
Vimentin	P08670	53.7	5.1	11/16	2.31	99%
heat shock Protein 90 (HSP90)	P08238	83.67	5	11/24	2.06	< 95 %
Carbamoylphosphatase synthetase	P27708	242.97	6	17/24	2.38	99%
Myosin heavy chain	P35579	228.08	5.5	13/23	2.33	99%
PI3-Kinase	O00750	184.73	6.7	7/10	1.36	< 95 %

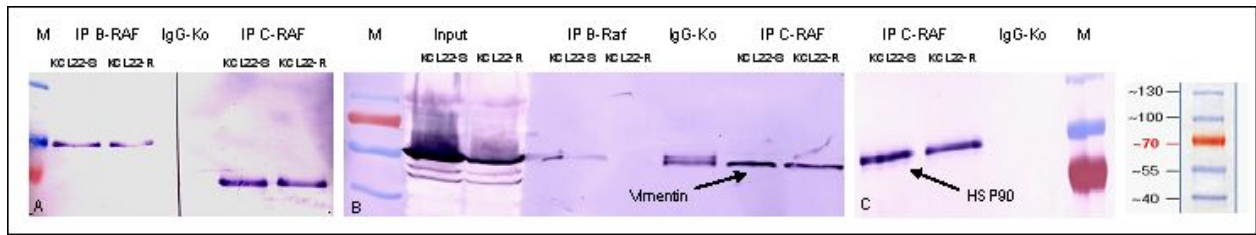


Abb. 44: Immunologische Verifizierung der massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von B-Raf und C-Raf. (A): Immunopräzipitation (IP) und anschließender Western Blot mit B-/C-Raf-AK. (B): IP mit B-/C-Raf-AK, Blot gegen Vimentin. (C): IP mit C-Raf-AK, Blot gegen HSP90. M = Marker.

#### 6.4.2 Der p70-S6K/mTOR Signalweg und PI3-Kinase/AKT Signalweg

Bei der Analyse der Zellproliferation mittels CASY konnte gezeigt werden, dass die resistenten Zellen durchschnittlich ca. 1-1,5  $\mu\text{m}$  größer waren als die Zellen der sensitiven Zelllinie (Abb. 47). Dies ist ein starker Hinweis auf eine veränderte Kontrolle des Zellwachstums. Vor allem der S6-Kinase/mTOR-Signalweg sowie der PI3-Kinase/AKT-Weg sind in die Steuerung von Zellwachstum und Anhäufung von Zellmasse involviert. Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren (Rapamycin, Wortmannin) wurde die Bedeutung dieser Signalwege für die Resistenzentwicklung der KCL22-R untersucht. Für den S6-Kinase-Hemmer Rapamycin konnte gezeigt werden, dass bereits sehr niedrige Konzentrationen (0,05  $\mu\text{M}$ ) ausreichen, um das Zellwachstum der sensitiven Zelllinie zu unterbinden. Durch die Kombinationstherapie mit Imatinib konnte der antiproliferative Effekt von Rapamycin noch verstärkt werden (Abb. 45, Tabelle 17 Anhang). Die resistente Zelllinie konnte sowohl in Anwesenheit von Imatinib als auch 0,1  $\mu\text{M}$  Rapamycin proliferieren, nicht jedoch bei gleichzeitiger Gabe beider Inhibitoren (Abb. 46, Tabelle 17 Anhang). Die Zellzahl konnte zu Versuchsende auf  $\frac{1}{4}$  reduziert werden. Der Zelldurchmesser als Indikator für die Vitabilität der Zellen wurde durch die Kombinationstherapie in der resistenten Zelllinie um ca. 2  $\mu\text{m}$  reduziert, während die alleinige Gabe von Imatinib nur zu einer Verringerung von 0,5  $\mu\text{m}$  führte (Abb. 47). Bei der sensitiven Zelllinie verstärkte sich der Effekt durch die Kombinationstherapie kaum (1  $\mu\text{m}$  bei Imatinib-Therapie, 1,4  $\mu\text{m}$  bei Kombinationstherapie).

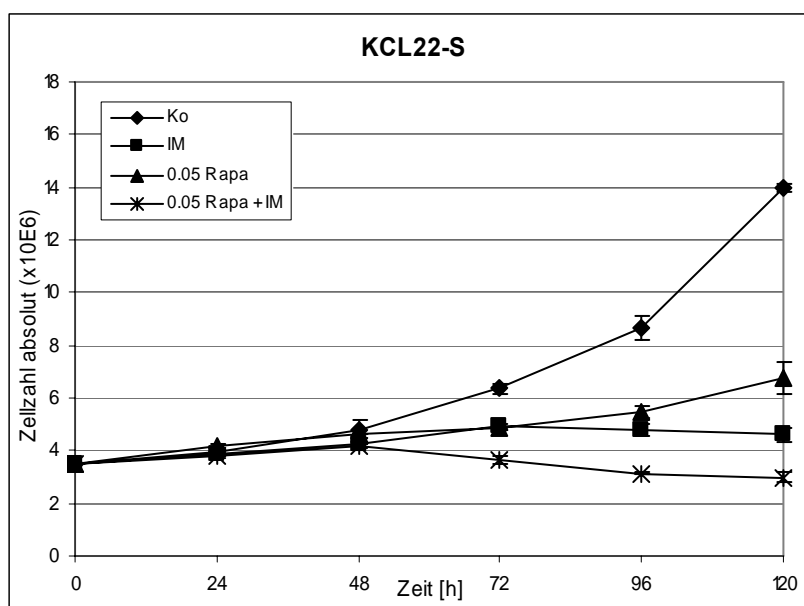


Abb. 45: Zellproliferation von KCL22-S unter Behandlung mit dem S6-Kinase-Hemmer Rapamycin (Rapa). Selbst bei geringen Konzentrationen (0,05  $\mu\text{M}$ ) kam es zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die Kombinationstherapie mit Imatinib (Rapa+IM) konnte diesen Effekt noch verstärken. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.

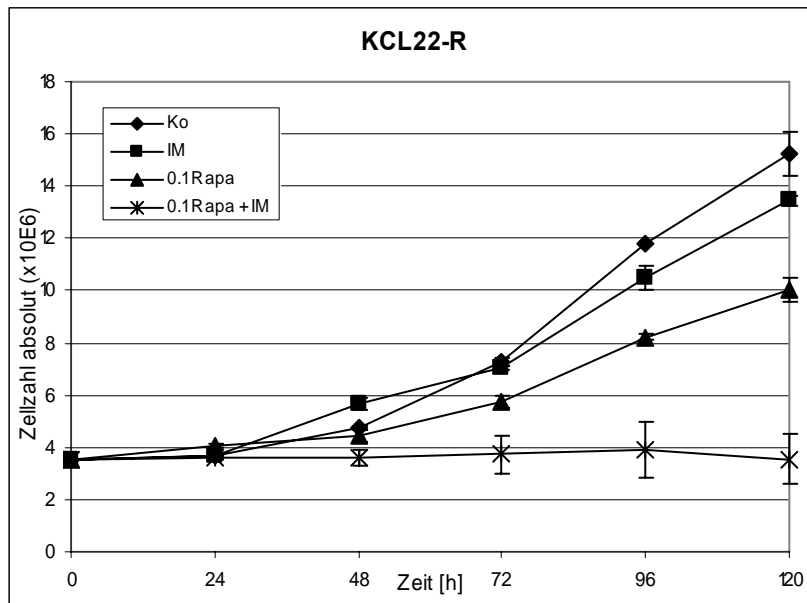


Abb. 46: Zellproliferation von KCL22-R nach Kombinationstherapie mit Rapamycin und Imatinib. Rapamycin (Rapa) allein hatte kaum messbaren Einfluss auf die Proliferation, jedoch bei gleichzeitiger Gabe mit Imatinib (Rapa+IM) können die Zellen nicht mehr wachsen. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.

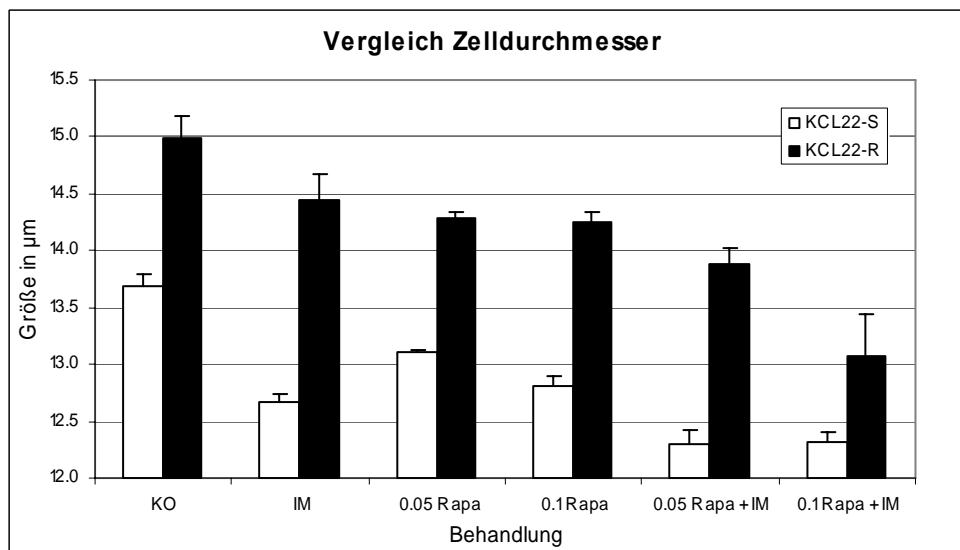


Abb. 47: Einfluss der Therapeutika auf den Zelldurchmesser. Imatinib und Rapamycin (Rapa+IM) in Kombination führten sowohl bei sensibler und resistenter Zelllinie zu einer Abnahme des Zelldurchmessers um ca. 1-2 µm. Die Zellen der resistenten Zelllinie zeigten durchschnittlich einen 1,5 µm größeren Durchmesser als die Zellen der sensiblen Zelllinie. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.

Der Einfluss der PI3-Kinase-Aktivität wurde in der Diplomarbeit von Jana Schiefner mit Hilfe von Wortmannin in Kombination mit Imatinib untersucht. Bereits bei einer geringen Konzentration von 0,005 µM Wortmannin konnte sowohl in sensibler als auch in resistenter Zelllinie Apoptose ausgelöst werden. Die kombinierte Gabe von Imatinib und Wortmannin führte in der resistenten Zelllinie zu einem leicht reduzierten Zellwachstum (Daten sind nicht gezeigt). Deutlicher ließ sich der Effekt der Blockierung des PI3-Kinase/AKT-Weges durch die Verwendung des AKT-Hemmers IL-6H zeigen. Bei einer Konzentration von 40-80 µM konnte eine Steigerung der Caspase3/7-Aktivität um mehr als 100 % sowohl in sensibler als auch in resistenter Zelllinie nachgewiesen werden. Auch die Zellproliferation der resistenten Zelllinie wurde durch die kombinierte Gabe von 40 µM IL-6H und 1 µM Imatinib um ca. 30-40 % reduziert (Daten sind nicht gezeigt).

### 6.4.3 Kombination von CI-1040, Rapamycin, LY294002 und Imatinib

Die Wirkung der Kombination der Inhibitoren auf die Mitglieder der verschiedenen Signalwege wurde mithilfe von Western Blot-Experimenten untersucht (s. Abb. 48). Dabei wurde deutlich, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL nur in Anwesenheit von Imatinib verhindert wird. Die anderen Inhibitoren beeinflussen BCR-ABL nicht. Wie schon für p-Mek und p-Erk gezeigt, ist auch für p-AKT nachweisbar, dass Imatinib in der resistenten Zelllinie keinen Effekt auf die Stärke der Phosphorylierung dieser Proteine hat (Spur 4), während in der sensitiven Zelllinie durch Imatinib eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung erreicht werden kann (Spur 3), die durch die Kombination mit Rapamycin noch verstärkt werden kann (Spur 11). Auch die Blockierung von Erk und BCR-ABL resultiert in einer Inhibition von AKT bei KCL22-S (Spur 15). Die Phosphorylierung der S6-Kinase wird nicht von CI-1040 beeinflusst, alle anderen Inhibitoren jedoch blockieren die Aktivierung der S6-Kinase bei KCL22-S (Daten sind nicht gezeigt). Imatinib hemmt p-S6-Kinase in KCL22-R nicht, auch nicht in Kombination mit CI-1040, obwohl dies in der KCL22-R eindeutig zu einer Inaktiverung von Erk führt (Spur 10 und 16). Interessanterweise führt sowohl die Blockierung der S6-Kinase als auch die Blockierung von AKT zu einer verstärkten Erk-Phosphorylierung in KCL22-R (Spur 6 und 8) und noch deutlicher nach Kombination beider Inhibitoren (Spur 18). Imatinib kann diesen Effekt verringern (Spur 12 und 14).

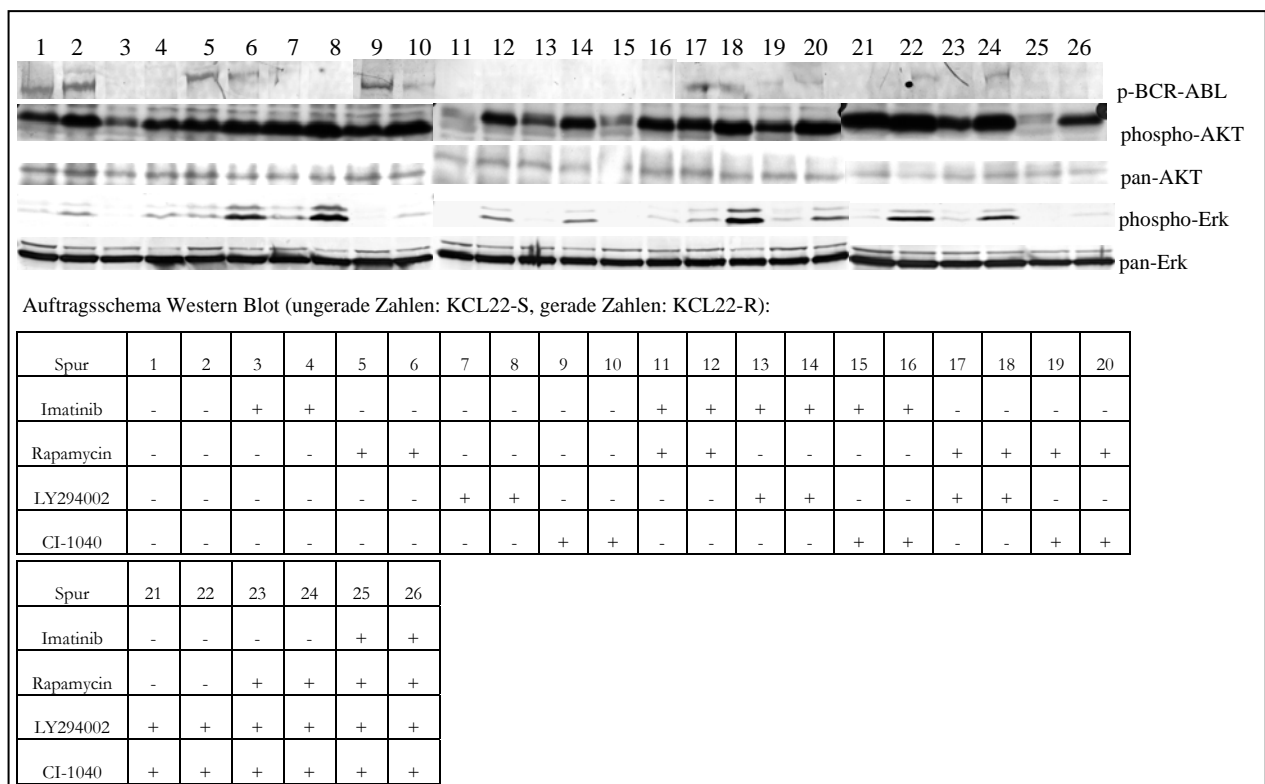


Abb. 48: Einfluss der Kombination der verschiedenen Inhibitoren auf die Phosphorylierung von BCR-ABL, AKT und Erk bei KCL22-S und -R. In Tabelle: Auftragsschema der verwendeten Kombinationen, Lysate der KCL22-S in ungerade nummerierten Spuren, die der KCL22-R in gerade nummerierte Spuren.

Die Apoptosemessung zeigte (Abb. 49, Tabelle 18, Anhang), dass die Behandlung mit Imatinib, Rapamycin und CI-1040 alleine keinen Effekt auf die Apoptose bei KCL22-R hat. Nur die Blockierung von AKT erzeugt einen deutlichen Effekt, die Apoptose steigt sowohl in sensitiven als auch in resistenten Zellen um das Dreifache an. Besonders potent für die Erhöhung der Apoptose erweisen sich auch folgende Kombinationen: Imatinib + LY294002 (8-fach in KCL22-S, 3-fach in

KCL22-R), Rapamycin + LY294002 (4-5-fach in S und R) sowie CI-1040 + LY294002 (12-fach in S, 4-fach in R) und natürlich die Drei- und Vierfachkombinationen. Es fällt auf, dass immer eine Beteiligung des AKT-Inhibitors zu verstärkten Effekten führt.

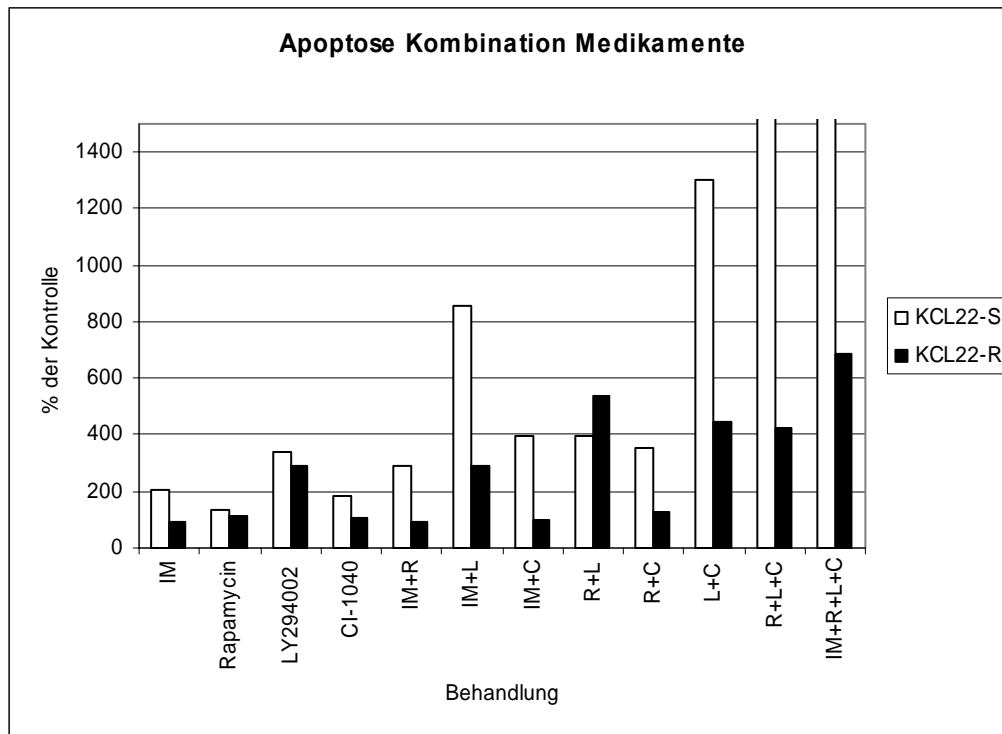


Abb. 49: Messung der Apoptose nach Kombination der verschiedenen Inhibitoren in KCL22-S und -R. Durch die Kombination aller Inhibitoren steigt die Apoptose in sensibler und resistenter Zelllinie deutlich an. IM=Imatinib, R=Rapamycin, L=LY294002, C=CI-1040.

#### 6.4.4 Auto- und Parakrine Faktoren

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Sezernierung von Wachstumsstoffen in das Medium als Reaktion auf die Imatinib-Therapie. Möglicherweise existiert bei der resistenten Zelllinie ein para- oder autokriner Mechanismus, der erst durch die Imatinib-Gabe ausgelöst wird. Durch den Wachstumsstoff könnte dann eine Resistenz gegenüber Imatinib vermittelt werden. Um diese Theorie zu untersuchen, gibt man Medium, welches durch die resistenten Zellen „konditioniert“ wurde, zu den sensiblen Zellen. Diese sollten, falls das Medium einen Schutz vor der Imatinib-Wirkung liefern sollte, wie die resistenten Zellen auch, in Anwesenheit von Imatinib proliferieren können. Ist dieser Wachstumsstoff in der Lage, in die unter 6.4.2 beschriebenen Signalwege einzugreifen, sollte außerdem die Zellgröße der sensiblen Zellen zunehmen.

Für dieses Experiment wurden resistente Zellen für fünf Tage in einem großen Ansatz mit Imatinib kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt, um das Imatinib zu entfernen und die Zellen weitere zwei Tage kultiviert, unter der Annahme, dass der eventuell sezernierte Stoff noch für einige Zeit weiter ins Medium abgegeben wird. Der Kulturüberstand dieser Zellen wurde dann sterilfiltriert, um Kontaminationen der sensiblen Zellen mit resistenten in Folgeversuch zu verhindern. Das konditionierte Medium wurde 1:1 mit frischem Medium gemischt, um ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Mit diesem konditionierten Medium wurden die Zellen ( $3 \times 10^5$ /ml in 3 ml-Ansatz) für knapp 2 Tage kultiviert und nach Imatinib-Zugabe täglich die Zellzahl mittels CASY und ATP-Messung wie unter 5.1.2 beschrieben, gemessen.

Durch die Verwendung des konditionierten Mediums war es schwierig, eine Wachstumskurve mit absoluten Zellzahlen zu erstellen. Daher sind die Messwerte in % der Kontrolle angegeben. Es

konnte gezeigt werden, dass die Imatinib-Wirkung bei der sensitiven Zelllinie durch die Verwendung des konditionierten Mediums (KM) um 10-20 % reduziert werden konnte (Anhang, Tabelle 19, Tabelle 20, Abb. 50). Trotzdem betrug die Zellzahl der sensitiven Zellen nach Imatinib-Behandlung zu Versuchsende nur noch 55 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es konnte also kein Alles-oder-Nichts-Effekt, sondern eher eine Sensitivitätsverminderung erzielt werden. Auch bei der resistenten Zelllinie lässt sich ein leichter Wachstumsvorteil der Zellen in konditioniertem Medium von 5-7 % erkennen. Der Zelldurchmesser lag bei den unbehandelten sensitiven Zellen bei ca. 13,8  $\mu\text{M}$ , unabhängig von der Verwendung der verschiedenen Medien. Die resistenten Zellen hatten durchschnittlich einen um 1,3  $\mu\text{M}$  größeren Durchmesser. Der Zelldurchmesser nahm bei den sensitiven Zellen sowohl in konditionierten als auch in Normalmedium nach Imatinib-Behandlung ab. Die Abnahme in konditioniertem Medium ist jedoch nur halb so groß ( $\sim 5,5$  % im Vergleich zur Kontrolle) wie bei der Verwendung von Normalmedium ( $\sim 9$  %). Bei der resistenten Zelllinie betrug der Unterschied im Zelldurchmesser zwischen konditioniertem Medium und Normalmedium nur 1 % (Tabelle 19, Tabelle 20, Anhang, sowie Abb. 51).

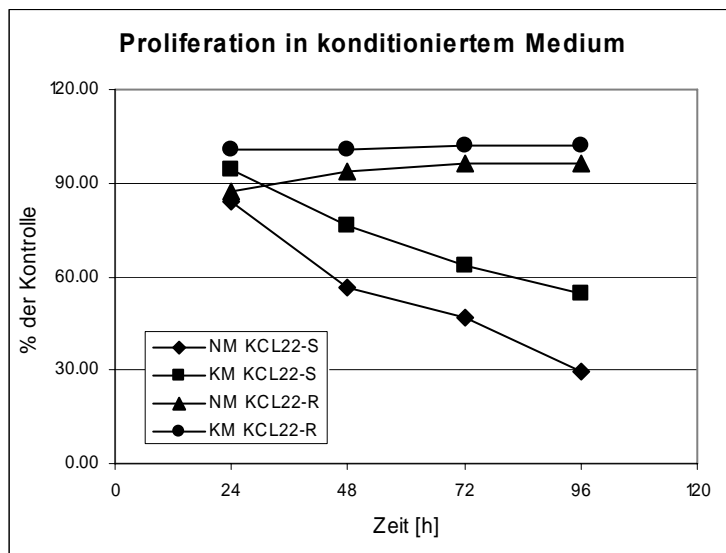


Abb. 50: Zellzahlentwicklung in % der Kontrolle. Imatinib wirkt bei den sensitiven Zellen in konditioniertem Medium (KM) weniger stark als bei den Zellen in Normalmedium (NM). Die beiden Ansätze der resistenten Zellen unterscheiden sich kaum.

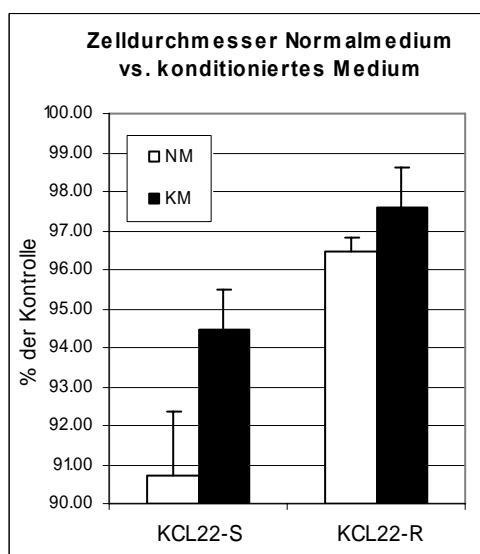


Abb. 51: Veränderungen des Zelldurchmessers von sensitiver und resistenter Zelllinie in konditioniertem und Normalmedium nach Imatinib-Behandlung in % der Kontrolle. Die sensitiven Zellen in Normalmedium weisen einen deutlich kleineren Durchmesser auf als in konditioniertem Medium, während bei den resistenten Zellen nur ein geringer Unterschied zu beobachten ist.



**Zusammenfassung**

Bei der Untersuchung BCR-ABL-assoziiierter Signalwege konnte eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges in den resistenten Zellen nachgewiesen werden, die auf eine dauerhafte Aktivität der Raf-Kinasen zurückzuführen war. Durch die kombinierte Therapie mit Imatinib und dem spezifischen Mek-Inhibitor CI-1040 konnte in den resistenten Zellen ein Proliferationsstop, jedoch keine Apoptose ausgelöst werden. Es konnten keine Unterschiede in der Expression von C-Raf, B-Raf und Erk nachgewiesen werden, auch die Aktivität von Ras war bei beiden Zelllinien ähnlich. Die gleichzeitige Blockierung des S6-Kinase/mTOR-Signalweges und von BCR-ABL konnte das Wachstum der resistenten Zellen um 75 % und den Zelldurchmesser um 2 µm verringern. Die Verwendung von konditioniertem Medium der resistenten Zelllinie als Analysemethode für parakrine Faktoren als Auslöser für die Resistenz zeigte einen Sensitivitätsverlust der KCL22-S gegenüber Imatinib von 20 %.

## 7 Diskussion

Die Analyse der Imatinib-Resistenz anhand des Zellkulturmodells KCL22 erfolgte auf drei Ebenen. Nach dem eindeutigen Beweis der Imatinib-Resistenz konnten zunächst bei der chromosomalen Charakterisierung zwei interessante Veränderungen gefunden werden, in der sich sensitive und resistente Zelllinie unterscheiden. Auf proteomischer Ebene wurden mittels SELDI und gelbasierenden Methoden eine Reihe von Markern gefunden, die zwischen Imatinib-sensitiver und Imatinib-resistenter Zelllinie diskriminieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die beiden untersuchten Zelllinien in mindestens einem Schlüsselsignalweg, dem MAPK-Signalweg unterschiedlich verhalten.

### 7.1 Beweis der Imatinib-Resistenz von KCL22-R

Die Voruntersuchungen der resistenten Zelllinie hinsichtlich Wachstumsverhalten und Apoptose in Anwesenheit des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib konnten eindeutig zeigen, dass die Zelllinie KCL22-R Imatinib-resistent ist. Bekannte Resistenzmechanismen wie Mutationen in der Imatinib-Bindestelle oder eine BCR-ABL-Überexpression konnten für KCL22-R ausgeschlossen werden. Imatinib blockiert effektiv die Phosphorylierung von BCR-ABL, wie mittels Western Blot gezeigt wurde. Somit ist sichergestellt, dass die Zelllinien, die von der AG Melo, London zur Verfügung gestellt wurden, in ihren Eigenschaften durch die Kultivierung nicht verändert wurden und die gleichen Eigenschaften aufweisen wie in der Arbeit von Mahon et al. (85) beschrieben.

Interessanterweise zeigte sich, dass die Zellen unter Imatinib-Therapie sogar einen leichten Proliferationsstimulus erhalten und dass die Apoptoserate geringfügig reduziert ist. Die Blockierung der BCR-ABL-Tyrosinkinase durch die Imatinib-Therapie scheint sich für die KCL22-R also sogar positiv auszuwirken. Diese Beobachtung bestätigt die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen anhand der Zelllinien K562 und Lama84 (114) und wurde teilweise auch bei Patienten gemacht (115). Erst eine zeitweilige Therapieunterbrechung führte zu einer Re-Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Imatinib. Aufgrund dieser Beobachtung werden die therapeutischen Strategien zur Überwindung der Imatinib-Resistenz ständig verbessert (116). Auf der Suche nach der Ursache für diesen Effekt muss man die komplexe Verflechtung von BCR-ABL in eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen betrachten (s. Einleitung). BCR-ABL beeinflusst nicht nur Signalwege, welche die Zellproliferation steigern, sondern auch solche, die Apoptose auslösen können. So aktiviert BCR-ABL z.B. Ras, welches wiederum über den MAPK-Signalweg Zellproliferation auslöst, andererseits über den JNK/SAPK-Signalweg zur Apoptose führt. In normalen Zellen befinden sich beide Wege in einem Gleichgewicht, in Tumorzellen kann es jedoch dazu kommen, dass z.B. durch Mutationen oder veränderte Regulation der Proteinaktivität einer der Wege herauf- oder herunterreguliert wird, was zu einer ungehinderten Zellproliferation führen kann. Wird nun, wie bei der Zelllinie KCL22-R das BCR-ABL-Molekül nachweislich von Imatinib blockiert, würde das für den Ras-Signalweg bedeuten, dass sowohl der pro-apoptotische als auch der proliferationsfördernde Teil dieses Signalweges inhibiert wird. Ist jedoch der proliferationsfördernde Teil über die MAPK durch Veränderungen unterhalb von Ras konstitutiv aktiviert (s. Abb. 52 \*), würde durch die Behandlung mit Imatinib nur der pro-apoptotische Weg inhibiert, was erklären würde, warum die Imatinib-Behandlung bei der resistenten Zelllinie zur Verringerung der Apoptose führt.

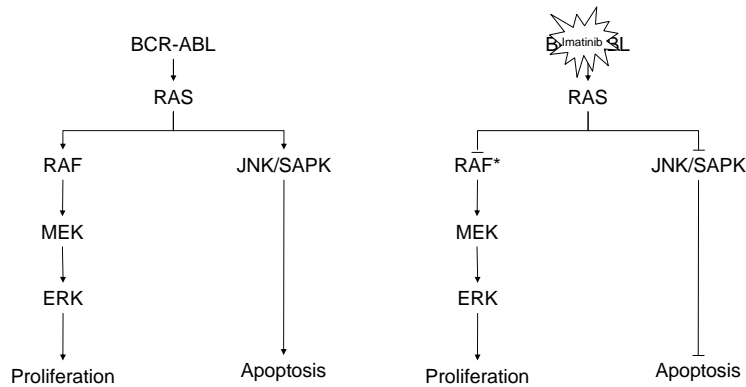


Abb. 52: Hypothetische Aktivierung des Ras-Signalweges mit und ohne Imatinib-Behandlung. Durch eine konstitutive Aktivierung von Raf könnte Imatinib bei KCL22-R anti-apoptotisch wirken.

## 7.2 Chromosomale Aberrationen der Zelllinien KCL22-S und -R

Die Analyse der Zelllinien KCL22-S und -R mit zytogenetischen und molekular-zytogenetischen Methoden ergab eine Reihe von Veränderungen im Vergleich zum normalen Karyotyp (s. 6.2.1). Das für die CML typische Philadelphia-Chromosom lag in zweifacher Form vor, ein für Tumorzellen von Patienten in der Blastenkrise typisches Merkmal (23 %, 83). Diese Duplikation führt aber nicht zu einer gesteigerten BCR-ABL-Expression und kann somit als Resistenzmechanismus ausgeschlossen werden (s. 7.1). Es konnte auch das reziproke Translokationsprodukt der(9)t(9;22)(q34;q11) nachgewiesen werden. Die Zelllinie exprimiert das Translokationsgen ABL-BCR auf sehr schwachem Niveau. Ein Fehlen von ABL-BCR wird kontrovers diskutiert. Einerseits wird es mit einer verschlechterten Prognose assoziiert (117), in anderen Studien konnte kein Zusammenhang zur Langzeitüberlebensrate nachgewiesen werden (118). Eine Veränderung an Chromosom 9 kann aber hier als Modulator der Imatinib-Resistenz ausgeschlossen werden. Zusätzlich zum Philadelphia-Chromosom wurden unter anderem Veränderungen am Chromosom 1 (im Detail: +der(1)t(1;10)(p13;?)), eine Trisomie 6, Trisomie bzw. Tetrasomie 8, eine Monosomie 13 sowie ein verändertes Chromosom 17 (der(17)t(17;19) gefunden. Die große Anzahl der Abberationen sind ein typisches Charakteristikum bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium, in der chronischen Phase zeigen nur 7 % der Patienten zusätzliche Abberationen, in der Blastenkrise steigt der Anteil auf das Zehnfache (79). Die Zelllinie KCL22-S und -R unterscheiden sich auf chromosomaler Ebene in zwei wesentlichen Veränderungen. In den Zellen der resistenten Zelllinie konnte überwiegend eine Tetrasomie 8 festgestellt werden, während die sensitive Zelllinie ausschließlich drei Kopien dieses Chromosoms aufwies. Aberrationen an Chromosom 8 sind die zweithäufigsten Veränderungen im Karyogramm von CML-Patienten (83), es wird ein Zusammenhang mit dem Protoonkogen c-Myc diskutiert, welches auf 8q24 lokalisiert ist. Dieser chromosomale Bereich ist in CML-Zellen häufig amplifiziert (119), was zu einer c-Myc-Überexpression und zur Progression des Tumors führen kann (49, 120). Dabei ist die Verbindung zum Ras-MAPK-Signalweg interessant. Ras kann über p53-abhängige und unabhängige Signalwege die Expression von CDK-Inhibitoren aktivieren und so Zellzyklus-Arrest auslösen (47). Dieser Mechanismus kann durch eine Überexpression von c-Myc verhindert werden (49) und könnte, im Kontext mit den Ergebnissen der Signaltransduktionsanalysen in den hier untersuchten Zelllinien eine Rolle spielen.

Als einziger struktureller Unterschied zwischen KCL22-S und -R wurde in der resistenten Zelllinie ein verändertes Chromosom 6 gefunden. An dem p-Arm von Chromosom 6 konnte Material von Chromosom 13 nachgewiesen werden. Mittels MCB konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 6 bei 6p11.1 festgelegt werden, für Chromosom 13 wurden in verschiedenen analysierten Metaphaseplatten variable Anteile an transloziertem Material von Chromosom 13 detektiert (s. 6.2.2). Der Bereich von 13q12-13qter wurde in unterschiedlicher Größe zum p-Arm von Chromosom 6 verlagert. Dabei erscheint vor allem die Region 13q14.3 interessant, in der das Rb-Gen lokalisiert ist. pRb ist ein Tumorsuppressorprotein. Es bindet an den Transkriptionsfaktor E2F und verhindert so den Übergang zur S-Phase. Wird pRb phosphoryliert, wird es inaktiviert und E2F wird frei und kann durch seine transkriptionelle Aktivität Gene anschalten, die zur Proliferation führen. Fehlt pRb durch eine Deletion auf beiden Allelen wie bei einer Reihe von Tumoren, unter anderem dem Retinoblastom, beschrieben (121), kann es E2F nicht mehr inhibieren, der Zellzyklus ist an dieser Stelle nicht mehr steuerbar und die Zellen wachsen unkontrolliert. Interphasekerne der Zelllinie KCL22-R wurden mit einer lokusspezifischen Sonde für den Bereich nach Imatinib-Behandlung und nach Imatinib-Deprivation analysiert. Dabei lässt sich feststellen, dass der Anteil der Zellen, die eine t(6;13) mit der Region 13q14.3 tragen und somit für diesen Bereich disom sind, sinkt, wenn die Imatinib-Therapie unterbrochen wird (s. 6.2.3). Die Region 13q14.3 scheint also für die Imatinibsensitivität eine Rolle zu spielen. Mittels Einzelzellkultivierung war es möglich, Klone mit einer Monosomie für 13q14 von solchen mit einer Disomie zu trennen. Mit Hilfe der SNP-Array-Technologie konnte der Bruchpunkt in der Region 13q14 genauer festgelegt und der deletierte Chromosomenbereich in den monosomen Klonen identifiziert werden. Der Bruchpunkt liegt in den monosomen Klonen bei 13q13.1, im Vergleich zu 13q21.1 bei den disomen Klonen. Die monosomen Klone weisen daher eine Deletion eines ca. 22 kb-größeren Bereichs auf als die disomen Klone. Gene, die in dem Bereich zwischen 13q13.1 und 13q21.1 liegen, könnten also im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Imatinib-Sensitivität stehen. Für den fraglichen chromosomalen Bereich sind derzeit 178 Gene beschrieben (Tabelle 21, modifiziert nach: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>). Darunter finden sich eine Reihe von Genen, die in Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation oder Signatransduktion beschrieben sind und somit als Kandidaten in Frage kämen. Allerdings findet sich keines dieser Gene im Kontext anderen vergleichender Analysen zwischen sensibler und resistenter Zelllinie. Eine Untersuchung der isolierten Klone mit unterschiedlichem Anteil an Material von Chromosom 13 ist im Rahmen eines beantragten Folgeprojektes geplant (s. 8. Ausblick).

### 7.3 Unterschiede in der Proteinexpression von KCL22-S und -R

Mit Hilfe von verschiedenen globalen proteomischen Ansätzen wurde nach Proteinen gesucht, die zwischen sensibler und resistenter Zelllinie diskriminieren. Dabei standen vor allem solche Proteine im Fokus, die in der Lage sind, die BCR-ABL-Funktion in den resistenten Zellen zu ersetzen, da diese (s. 7.1) auch bei dauerhaft blockierter BCR-ABL-Tyrosinkinase wachsen können. Es ist also möglich, dass in der resistenten Zelllinie vermehrt andere Kinasen exprimiert werden, die die Funktion von BCR-ABL übernehmen. Es wurden verschiedene Techniken genutzt, um ein möglichst großes Spektrum an differentiell exprimierten Proteinen untersuchen zu können. Die SELDI-Technik eignet sich dabei besonders gut für niedrig exprimierte Proteine mit eher geringem Molekulargewicht bis ca. 20 kDa. Außerdem bietet die SELDI-Technik aufgrund der verschiedenen

chromatographischen Oberflächen den Vorteil, dass auch unfractionierte Proben verglichen werden können. Für die Identifizierung großer Proteine eignen sich eher Gelbasierte Techniken, vor allem die 2D-Elektrophorese oder, nach Vorfraktionierung auch 1DE. Von Vorteil ist, dass hier die Proteine, die im Gel sichtbar sind, relativ einfach mittels Peptide Mass Fingerprint (PMS) identifiziert werden können, was bei der SELDI-Technologie aufgrund der geringen Proteinmengen und -größen oftmals schwierig ist.

### 7.3.1 Identifizierung von RAB7B als Marker für KCL22-R mittels SELDI und Q-PCR

Die massenspektrometrische Analyse mittels SELDI-TOF ergab eine Reihe an Signalen (*peaks*), die eindeutig der sensitiven oder der resistenten Zelllinie zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung dieser Signale zu bestimmten Proteinen durch tryptischem Verdau war jedoch nicht möglich. Für Signale bis 3 kDa ist eine Tandem-MS-Analyse möglich. Die diskriminierenden Signale befanden sich in einem Massenbereich von 5-10 kDa und waren somit in der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung nicht nachweisbar und für eine Tandem-MS-Untersuchung zu groß. Die einzige Möglichkeit der Identifizierung ist die chromatographische Aufreinigung der interessierenden Peaks. Die SELDI-Analyse wurde allerdings schon anhand von vorfraktionierten Proben durchgeführt, um abundante Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Daher waren die Proteinkonzentrationen relativ gering, was zu einer eher niedrigen Signalstärke in der MS-Untersuchung führte. Eine weitere Aufreinigung der Proteine war daher nicht möglich. Anhand der Vorfraktionierung (nach isoelektrischem Punkt) konnten die detektierten Peptide oder Proteine jedoch wenigstens einem pI-Bereich zugeordnet werden und somit die Anzahl möglicher Kandidaten nach Datenbankrecherche etwas eingegrenzt werden. Jedoch erwies sich keiner der Kandidaten als so aussichtsreich, dass eine immunologische Verifizierung als lohnend angesehen wurde. Einzig für den Peak mit einem Molekulargewicht von 7450 Da konnte mit RAB7B ein vielversprechender Kandidat ermittelt werden. Dieser Befund konnte allerdings nicht immunologisch überprüft werden, dass kein Antikörper erhältlich war. Der Nachweis erfolgte indirekt über quantitative PCR, bei der eine 87fach höhere Expression von RAB7B in den resistenten Zellen im Vergleich zur sensitiven Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Die Expression dieses Proteins scheint Imatinib-sensitiv zu sein, die Expression nimmt in den behandelten Zellen um den Faktor 13 in den resistenten und um das 50-fache in den sensitiven Zellen zu. Das Gen für RAB7B liegt auf Chromosom 1q32 und codiert für eine kleine GTPase, die zur Ras-Superfamilie gehört. RAB7B wird unter anderem in peripheren Blutzellen, speziell in Monozyten, aber auch in Leukämie-Zelllinien exprimiert und ist in der Zelle mit den Lysosomen assoziiert (122). Es ist beschrieben, dass die Expression von RAB7B deutlich zunimmt, wenn Leukämiezellen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) behandelt werden. PMA-Behandlung führt zur Differenzierung der Promyelozyten und somit zu vermindertem Zellwachstum. Es wird vermutet, dass RAB7B Funktionen der Monozyten wie vermehrte Phagozytose reguliert. Darüber hinaus wurde kürzlich beschrieben, dass RAB7B TLRs (Toll-like receptors) negativ reguliert, indem es diese verstärkt der lysosomalen Degradierung zuführt. TLR, speziell TLR4 spielt über die Aktivierung der Signalwege MAPK, NFκB und IRF3 eine Rolle bei der Induktion der Immunantwort, eine Überaktivität von TLR4 kann zu chronischer Entzündung führen. RAB7B scheint am lysosomalen Abbau von TLR4 beteiligt zu sein und somit indirekt zu einer Inaktivierung der eben genannten Signalwege zu führen (123). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Daten aus der Signaltransduktionsanalyse

(s. 7.4.1), aus der deutlich hervorgeht, dass der MAPK-Signalweg in den resistenten Zellen stärker aktiviert ist als in den sensitiven Zellen und dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch die Imatinib-Therapie in den resistenten Zellen nicht unterbrochen sondern eher noch verstärkt wird.

### 7.3.2 Gelbasierte Identifizierung von sieben differentiell exprimierten Proteinen

Die vorfraktionierten Zelllysate der Zelllinien KCL22-S und R, die für die SELDI-Untersuchungen verwendet wurden, wurden auch anhand eindimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung auf Expressionsunterschiede untersucht. Desweiteren wurden unfractionierte Lysate anhand von zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und Expressionsmuster nach Coomassiefärbung verglichen. Unterschiedlich stark gefärbte Banden bzw. Spots wurden ausgestochen und anhand von tryptischem Verdau identifiziert. Sowohl in 1DE als auch in 2DE konnten die Proteine Enolase (in KCL22-S), Carbonic Anhydrase (in KCL22-R), hnRNP A2/B1 (in KCL22-R) und SH3-domain binding glutamic acid rich protein 3 (in KCL22-R) als differentiell exprimiert nachgewiesen werden. Die Enolase wurde in zwei verschiedenen Isoformen,  $\alpha$  und  $\gamma$  gefunden. Nach 2DE konnten eine Reihe von interessant erscheinenden Proteinen als differentiell exprimiert detektiert werden, unter anderem die Heat-Shock-Proteine HSP27 und HSP70, Vimentin sowie die oben genannten auch nach 1DE nachgewiesenen Proteine.

Die Enolase wurde im 1- und 2DE-Experiment in der Zelllinie KCL22-S höher exprimiert gefunden wurde als in KCL22-R, im Western Blot zeigte sich jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Möglicherweise war der gesamte große Spot im 2DE-Gel die Enolase und wäre somit auch im 2DE-Experiment in KCL22-R eindeutig stärker exprimiert. In jedem Fall sind die Daten aus den Western Blot-Experimenten überzeugender und somit konnte klar gezeigt werden, dass die Enolase in den resistenten Zellen stärker exprimiert ist und die Expression mit steigender Imatinib-Konzentration zunimmt. Die Enolase kommt in drei Isoformen,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  vor. Die  $\alpha$ -Enolase (Expasy-nr.: P06733) wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und katalysiert die Dehydrierung von 2-Phospho-D-Glycerat (PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEG) (124). Die  $\gamma$ -Enolase (Expasy-nr.: P09104) katalysiert die gleiche Reaktion in Neuronen. Die Isoformen bilden gewebsspezifisch Homo- oder Heterodimere, wobei  $\alpha\alpha$ -Homodimere in den meisten embryonalen und adulten Geweben vorkommen,  $\alpha\gamma$ -Heterodimere bzw.  $\gamma\gamma$ -Homodimere jedoch auf Nervenzellen beschränkt sind. Enolasen kommen unter anderem auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen vor und können als Plasminogen-Rezeptor fungieren. Weiterhin ist beschrieben, dass die Expression von Enolasen in sich teilenden Zellen deutlich erhöht ist im Vergleich zu Zellen in der stationären Phase. Die Funktionen der Enolase sind vielfältig. Unter anderem kann sie als Myc-bindendes Protein (MBP-1) und somit als negativer Regulator des Protoonkogens c-myc wirken, wodurch die Enolase zum Tumorsuppressor wird. Weiterhin wird die Expression der Enolase als Reaktion auf hohe Temperaturen und Glukosemangel induziert, es wirkt dann als *heat shock*-Protein. Die  $\alpha$ -Enolase wird als Marker für viele Tumoren beschrieben, unter anderem als Leukämie-assoziiertes Antigen (LAA) in Serum von CML-Patienten in der chronischen Phase (125). Diese beiden Fakten lassen sich gut mit der Überexpression der Enolase in KCL22-R bzw. der Imatinib-Behandlung in Deckung bringen. Die Expression der Enolase scheint also eher ein Resultat der Imatinib-Therapie als ein Auslöser der Resistenz zu sein.

Vimentin als Zytoskelettprotein (SwissProt-ID: P08670) wurde wie die Enolase in der sensitiven Zelllinie höher exprimiert nachgewiesen als in der resistenten Zelllinie (s. 6.3.4, Abb. 34). Es gehört

zu der Typ-III-Klasse von intermediären Filamentproteinen und wird in einer Vielzahl von Gewebe- und Tumorarten, unter anderem in etwa 50 % aller Leukämiearten, exprimiert (126). Vimentin spielt eine Rolle für die mechanische Stabilität und Beweglichkeit der Zellen (127). Es kann durch verschiedene Kinasen wie PKA, PKC und die cAMP-abhängige Kinase phosphoryliert werden (128). In sich teilenden Zellen wird Vimentin verstärkt phosphoryliert, da hier das Zytoskelett reorganisiert wird. Auch die Expression von Vimentin ist abhängig vom Zellzyklus, werden Zellen in der G0-Phase durch Serum oder PDGF stimuliert, steigt die Expression von Vimentin (129). Es scheint außerdem eine Rolle bei der Reifung von myeloiden Zellen zu spielen, wird die Maturation von Zellen mit verschiedenen Chemikalien bzw. Chemotherapeutika ausgelöst, steigt die Expression von Vimentin (130, 131). Vimentin interagiert über eine Phosphopeptidbindestelle (Aminosäuren 1-96) mit 14-3-3-Proteinen und führt zu einer Sequestrierung von 14-3-3-Proteinen. Diese Reaktion stört die Bindung anderer 14-3-3-Interaktionspartner, unter anderem der Raf-Protoonkogene, wodurch eine Aktivierung von Raf verhindert wird (132, 133). Möglicherweise lässt sich darüber die erhöhte C-Raf-Aktivität in den resistenten Zellen erklären. Eine verminderte Expression von Vimentin in KCL22-R resultiert in einer reduzierten Sequestrierung von 14-3-3-Proteinen, die somit frei für ihre anderen Bindungspartner sind und diese über Phosphorylierung aktivieren können. Diese Theorie kann dadurch untermauert werden, dass Vimentin als Interaktionspartner von C-Raf nachgewiesen werden konnte (s. 6.4.1, Abb. 44 und 134). Es ist beschrieben, dass Vimentin von C-Raf-assoziierten Kinasen wie der Casein-Kinase 2, jedoch nicht von C-Raf selbst phosphoryliert wird. Diese Kinasen sind in ihrer Aktivität durch C-Raf reguliert, daher ist eine Phosphorylierung von Vimentin indirekt an die Aktivierung von C-Raf gekoppelt, was im Kontrast zu der vorher gestellten Hypothese steht. Möglicherweise kommt die erhöhte Expression von Vimentin in den sensitiven Zellen aber auch durch eine Feedback-Schleife zustande, bei der eine verminderte Aktivität von Raf zu einer reduzierten Aktivität von Vimentin führt und somit die Zelle als Ausgleich die Expression von Vimentin steigert (s. Abb. 53).

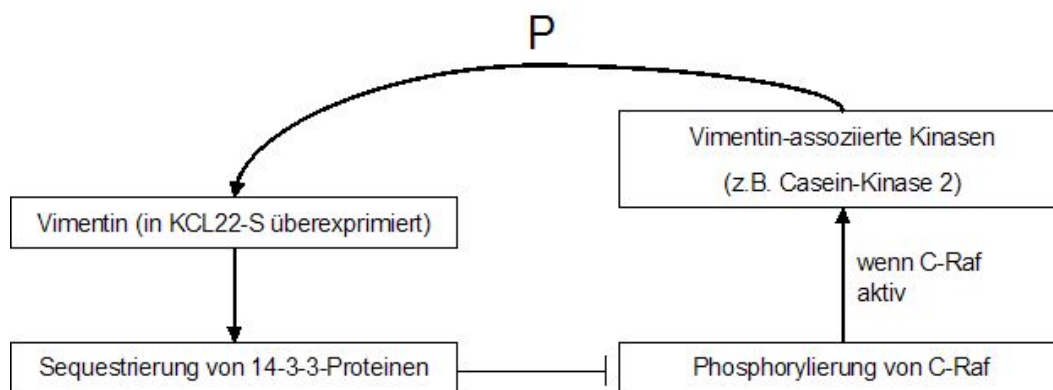


Abb. 53: Modell zur Erklärung der Überexpression von Vimentin den sensitiven Zellen

Die Heat-Shock-Proteine HSP27 und HSP70 (hier speziell HSP70/9) wurden als diskriminierend für die beiden Zelllinien identifiziert, interessanterweise ist die Expression von HSP 27 in der sensitiven Zelllinie erhöht (s. Abb. 33) und die von HSP70 in der resistenten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von HSP27 nach Imatinib-Gabe steigt. Heat-Shock-Proteine wirken als Chaperone und spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und dem Transport von Proteinen innerhalb der Zelle zu verschiedenen Kompartimenten (135). Durch ihre vielen Interaktionspartner spielen sie daher eine wichtige Rolle im zellulären Netzwerk, unter anderem bei der Regulation der Apoptose. In Tumorzellen sind vor allem die Heat-Shock-Proteine 27 und 70 stark überexprimiert.

In Nagern verstärkt eine HSP-Überexpression das Tumorstadium und das Metastasierungspotential, eine Beteiligung an Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika wird ebenfalls diskutiert. Heat-Shock-Proteine spielen außerdem, wie auch Vimentin, eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen, die Expression von HSP27 wird während der Differenzierung induziert, was mit einer verminderten Zellteilung einhergeht. HSP70 verhindert während der erythroiden Differenzierung durch die Bindung des Transkriptionsfaktors GATA-1 dessen Abbau und ermöglicht somit das Überleben des Erythroblasten seine weitere Differenzierung (136). Die Überexpression von HSP27 in Imatinib-sensitiven Zellen wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt (88), ebenfalls wurde HSP70 bereits in Zusammenhang mit Imatinib-Resistenz beschrieben (137). Beide Arbeiten verwenden jedoch jeweils andere Zelllinien, die nicht initial resistent gegenüber Imatinib sind, sondern durch steigende Gaben von Imatinib die Resistenz erlangt haben (s. unten hnRNPs).

HSP27 (SwissProt-ID: P04792) gehört zusammen mit  $\alpha$ -Crystallin zur Klasse der kleinen Heat-Shock-Proteine und wird in nahezu allen Zelltypen exprimiert. Es ist ein ATP-unabhängiges Chaperon und schützt Zellen vor Proteinaggregation (136). In ungestressten Zellen liegt es in der A-Isoform in einem 500-800 kDa-großen Proteinkomplex vor. Nach Stressinduktion kommt es rasch zu einer Phosphorylierung, zur Entstehung von zwei weiteren Isoformen, B und C und/ oder zur gesteigerten Synthese von HSP27 (138). Die Oligomerisierung scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation der Chaperonaktivität von HSP27 zu haben, weil dadurch die Affinität zu verschiedenen Proteinen verändert wird. Die durch differenzierende Agenzien, Mitogene, Cytokine oder Chemotherapeutika induzierte Phosphorylierung von HSP27 wird durch die MAPKAP-Kinasen 2 und 3 katalysiert und führt zur De-Oligomerisierung von HSP27. HSP27 kann über mehrere Wege Einfluss auf die Apoptose nehmen, unter anderem ist beschrieben, dass HSP27 mit AKT interagiert, wodurch AKT phosphoryliert und somit stabilisiert wird. Stabiles Akt induziert die Phosphorylierung von Bad, welches dadurch von Bcl-XL dissoziiert und von 14-3-3-Proteinen sequestriert wird und so seine Translokation zu den Mitochondrien verhindert. Apoptotische Signale werden somit nicht weitergeleitet. Wird die Interaktion zwischen HSP27 und AKT aufgehoben, wird AKT aktiviert und es kommt zur konstitutiven Apoptose. Andere anti-apoptotische Wege über HSP27 sind die negative Regulation der Procaspase-9 und die Inhibition der Procaspase-3. HSP27 kann aber auch pro-apoptotisch wirken, indem es die TNF-induzierte Degradation von I $\kappa$ B und somit das NF $\kappa$ B-vermittelte Zellüberleben verhindert (135).

HSP70/9 (SwissProt-ID: P38646), auch Mortalin oder mitochondriales HSP75 genannt, gehört zur Klasse der HSP70-Familie. HSP70-Proteine sind im Gegensatz zu den kleinen HSPs ATP-abhängige Chaperone. Sie bestehen aus zwei funktionellen Regionen, einer Peptidbindedomäne, welche C-terminal ein Chaperon-Motiv enthält und für die Substratbindung und die Rückfaltung wichtig ist und einer aminoterminal gelegenen ATP-Bindedomäne (136). HSP70 wirkt vor allem anti-apoptotisch, es schützt Zellen vor Zytotoxizität, ausgelöst durch TNF, Monozyten, oxidativem Stress und Chemotherapeutika. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Überexpression von HSP70 in den resistenten Zellen, da diese kontinuierlich mit Imatinib behandelt wurden. HSP70 inhibiert direkt oder indirekt die Phosphorylierung von JNK, dadurch wird die Aktivierung von Bax und somit die Triggerung von apoptotischen Signalen über eine Cytochrom-C-/AIF-Freisetzung verhindert. HSP70 moduliert auch die Phosphorylierung von Erk und bindet an PKC und, wie bei HSP27 beschrieben, an AKT, was zu einer Stabilisierung von AKT führt. Auch für HSP70 wird ein



pro-apoptotischer Signalweg beschrieben, indem es unterhalb der Caspase-3 mit der Caspase-aktivierten DNase interagiert und somit die Fas/Apo-1/CD95-vermittelte Apoptose verstärkt (135). Eine Überexpression von HSP70 in Zusammenhang mit einer Imatinib-Resistenz wurde 2007 erstmals beschrieben. Sowohl in Zelllinien (K562-r) als auch in den Blasten von Imatinib-resistenten Patienten wurde eine Überexpression von HSP70 nachgewiesen und ein Zusammenhang zur Zellproliferation und zum Ansprechen auf Imatinib hergestellt (137). Schon in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich das HSP70, welches von Tumorzellen exprimiert wird, von dem normaler Zellen unterscheidet und durch die Präsentation an der Zelloberfläche eine Immunität des Tumors hervorrufen kann. Eine Immuntherapie mit diesem Tumorspezifischen HSP70 konnte in klinischen Studien das zytogenetische und molekulargenetische Ansprechen auf die Imatinib-Therapie verbessern (139).

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang das Auftreten eines weiteren Heat-Shock-Proteins, des HSP90. Es wurde zwar in der vorliegenden Arbeit nicht als differentiell exprimiert in den beiden Zelllinien, aber als Interaktionspartner von C-Raf gefunden. Es ist allerdings beschrieben, dass HSP90 in Imatinib-resistenten Zellen überexprimiert vorliegt (88). Das als Chaperon wirkende HSP90 kommt in zwei Isoformen vor und wird in nahezu allen Zelltypen konstitutiv exprimiert, unabhängig von ihrem Stresszustand. Es ist bereits als Interaktionspartner von C-Raf beschrieben, interagiert jedoch noch mit einer Vielzahl weiterer Proteine, unter anderem Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung von ATP und die daraus folgende Konformationsänderung kann HSP90 seine Interaktionspartner binden und deren Reifung bewirken (140). Möglicherweise führt die Interaktion von HSP90 und C-Raf in den resistenten Zellen zu einer verbesserten Stabilität von C-Raf und damit zu einer länger andauernden, durch Imatinib schwer zu inhibierenden Aktivierung, die schlussendlich in der konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges resultiert. Ein ähnliches Phänomen ist für die Interaktion von HSP90 mit Vimentin beschrieben, die Autoren zeigen, dass eine Behandlung der Zellen mit Geldanamycin, einem spezifischen HSP90-Antagonisten, zur drastischen Reduktion von Vimentin und anderen Interaktionspartnern von HSP90 führt (141). Eine Überprüfung der Hypothese für die Stabilität von C-Raf steht noch aus (s. 8. Ausblick).

Die zytoprotektive Funktion von HSP90 wird unter anderem durch die Interaktion mit phosphoryliertem AKT vermittelt, welche ein Wachstumsfaktor-induziertes Überlebenssignal generiert. In vielen Tumorarten ist HSP90 überexprimiert, es ist beschrieben, dass HSP90 die Evolution resistenter Klone durch die Förderung von Mutationen und Polymorphismen begünstigt. Weiterhin konnte kürzlich im Mausmodell gezeigt werden, dass die Inhibition von HSP90 durch einen neuen Inhibitor IPI-504 zum verstärkten Abbau von BCR-ABL-Mutanten führt und so das Überleben der Mäuse verlängert werden konnte (142). Aber auch für BCR-ABL-unabhängige Resistenzen gegenüber Imatinib scheint HSP90 eine Rolle zu spielen. In resistenten Klonen der Zelllinie K562 konnte eine aberrante Acetylierung von HSP90 durch die Hochregulierung von Histondeacetylasen nachgewiesen werden. Im Gesamtkontext dieser Arbeit ist außerdem von Bedeutung, dass die Transkription von HSP90 durch c-myc aktiviert wird (140). Eine Überexpression konnte jedoch weder für c-myc noch für HSP90 gezeigt werden, daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Mechanismus für die Resistenzentwicklung in KCL22-R keine Rolle spielt.

Die Carbonic Anhydrase II (CAII, SwissProt-ID: P00918) wurde, möglicherweise in mutierter Form, mittels 2DE in KCL22-R als überexprimiert gefunden. Die Familie der Carbonic Anhydrasen besteht aus 14 Isoformen, wobei man zwischen zytosolischen (I, II, III und VII), mitochondrialen (Va und b), sekretorischen (VI) und Membran-assoziierten Enzymen (IV, IX, XII und XIV) unterscheidet. Die Carbonic Anhydrasen spielen eine Rolle bei der Azidifizierung des extrazellulären Milieus, sie katalysieren die Reaktion  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . Durch das Zusammenspiel mit Ionentransportern kommt es zur Entstehung eines pH-Gradienten zwischen dem Zellinneren und dem Extrazellularraum, was als progredienter Faktor für das Tumorwachstum und die Invasion von Tumorzellen beschrieben ist (143). CAII ist ein hochaktives, zytosolisches Enzym, was in Zellen vieler Leukämiearten, unter anderem auch CML überexprimiert vorkommt (144). Mutationen im CAII-Gen können zum Carbonic anhydrase (CA) isoenzyme II deficiency Syndrom führen, dessen Symptome unter anderem Osteoporose oder mentaler Retardierung sind (145). Ein Zusammenhang zur Imatinib-Resistenz ist bislang nicht beschrieben. Unterschiede im pH-Wert der Medien der Zelllinien KCL22-S und R wurden nicht untersucht, allerdings könnte hier ein Zusammenhang zu den Versuchen mit dem konditionierten Medium konstruiert werden (s. 6.4.4). Dabei wurde ein Sensitivitätsverlust der KCL22-S gegenüber Imatinib festgestellt, wenn die Zellen mit dem Kulturüberstand der resistenten Zellen kultiviert werden. Bislang bestand hier die Theorie, dass die resistenten Zellen möglicherweise als Reaktion auf die Imatinib-Therapie Stoffe sezernieren, die zur Resistenz gegenüber Imatinib führen und durch die Medium-Übertragung weitergegeben werden können.

Als ein weiteres differentiell exprimiertes Protein wurde die A2/B1-Isoform des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins (hnRNP A2/B1) gefunden. Dieses Protein ist in KCL22-R überexprimiert. Es gibt ca. 20 verschiedene Isoformen der hnRNPs. Sie spielen eine Rolle bei der mRNA-Prozessierung und regulieren die Transkription. HnRNPs aktivieren die Translation von c-myc. HnRNPs sind in vielen proteomischen Analysen als Marker für bestimmte Krankheiten beschrieben. In der Arbeit von Ferrari et al. (88) wurde in einem ähnlichen Ansatz wie in der vorliegenden Arbeit Imatinib-sensitive und resistente Klone der CML-Zelllinie LAMA84 nach 2DE unter anderem verschiedene hnRNPs gefunden, die in den resistenten Klonen überexprimiert sind. Allerdings spricht die parentale Zelllinie LAMA84 im Gegensatz zu KCL22 auf Imatinib-Therapie an (73). Die resistenten Klone wurden durch die kontinuierlich steigende Gabe von Imatinib generiert (85) und sind daher als Modell für die initiale Imatinib-Resistenz nicht verwendbar. Es ist beschrieben, dass BCR-ABL die Expression und Aktivität von hnRNPs über MAPK steigert (146). Eine Inhibition von BCR-ABL mittels Imatinib führte in dieser Arbeit zu einer Herunterregulierung des hnRNP-mRNA-Levels. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Daten aus unseren eigenen Versuchen, da hier trotz gehemmter BCR-ABL-Phosphorylierung durch Imatinib-Therapie eine Überexpression von hnRNP A2/B1 bestehen bleibt. Möglicherweise ist diese Überexpression ein Teil des Resistenzmechanismus und ein weiterer Hinweis darauf, dass die BCR-ABL-Funktion in KCL22-R durch andere Proteine übernommen bzw. ersetzt wird.

Über das SH3-Domänen-bindende Glutaminreiche Protein 3 (Swiss-Prot-Nr.: Q9H299), welches mittels 1DE und 2DE in KCL22-R überexprimiert gefunden wurde, ist bislang wenig bekannt. In einem Hochdurchsatz-Biomarkerscreening an Gehirntumoren wurde es in Glioblastomen hochreguliert gefunden, allerdings kein funktioneller Bezug auf die Tumorentstehung genommen (147). SH3BGL3 wird ubiquitär exprimiert und weist eine Ähnlichkeit mit dem Glutaredoxin 1

(GRX1) von *E. coli* auf, wobei ihm jedoch für die enzymatische Aktivität ein entscheidender Cysteinrest fehlt. Es wird vermutet, dass SH3BGRL3 ein endogener Modulator von GRX1 ist (148). SH3BGRL3 gehört zur Thioredoxin-Superfamilie und liegt auf Chromosom 1p34.3-35. Ein Zusammenhang zu Imatinib bzw. zur Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib ist bislang nicht beschrieben. Allerdings zeigten Majid et al. (149), dass SH3BGRL-Proteine im Zusammenhang mit der NFkB-vermittelten Transformation von lymphoiden Tumorzellen steht. Die Expression von SH3BGRL ist deutlich vermindert, wenn in der Zelle das Onkogen v-Rel exprimiert wird.

## **7.4 Analyse der BCR-ABL-assoziierten Signalwege**

### **7.4.1 Die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges in KCL22-R und seine Rolle für die Imatinib-Resistenz**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass der MAPK-Signalweg für das Überleben der Imatinib-resistenten Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem BCR-ABL-Hemmer Imatinib und einem spezifischen Inhibitor von Mek (CI-1040) konnte ein Wachstumsstop in den resistenten Zellen ausgelöst werden, der jedoch nicht durch Apoptose verursacht wurde. In den sensitiven Zellen verstärkte die gleichzeitige Gabe von Imatinib und CI-1040 den Effekt der durch Imatinib allein verursacht wurde. Desweiteren konnte die Apoptoserate bei simultaner Behandlung mit beiden Inhibitoren in KCL22-S verdoppelt werden (s. 6.4.1, Abb. 36 und Abb. 37). Diese Daten verdeutlichen die Wichtigkeit des MAPK-Signalweges für beide Zelllinien. In Western-Blot-Experimenten konnte durch die Verwendung phospho-spezifischer Antikörper außerdem gezeigt werden, dass sowohl die Mek- als auch die Erk-Phosphorylierung in den sensitiven Zellen durch die Behandlung mit Imatinib verhindert werden kann. In den resistenten Zellen war kaum ein Effekt der Imatinib-Therapie zu sehen, eher im Gegenteil, die Imatinib-Gabe verstärkte die Phosphorylierung von Mek und Erk in KCL22-R noch. Die Expression auf mRNA-Ebene von Erk sowie C-Raf und B-Raf unterscheidet sich in den beiden Zelllinien nicht (Abb. 43). Der Mek-Inhibitor CI-1040 ist in beiden Zelllinien in der Lage, die Erk-Phosphorylierung zu unterbinden, sogar in sehr niedrigen Konzentrationen von 0,05-0,1  $\mu\text{M}$  (s. Abb. 42). Eine synergistische Wirkung von Imatinib und verschiedenen Mek-Inhibitoren ist in vitro bereits beschrieben (150). Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor CI-1040 wird sogar schon in klinischen Studien angewendet (151), allerdings nicht in Kombination mit anderen Tyrosinkinaseinhibitoren. In der genannten Studie konnte gezeigt werden, dass der Mek-Inhibitor CI-1040 auch das Wachstum von Tumorzellen hemmt, die eine Mutation in Ras oder Raf aufwiesen. Andere Ursachen der konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges wurden allerdings nicht untersucht, es finden sich auch keine prozentualen Angaben über die gefundenen Ursachen. Auf der Suche nach dem Grund der konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges in KCL22-R konnten wir eine Überaktivität von Ras, die häufig durch Mutationen verursacht werden und in vielen verschiedenen Tumorarten vorkommen (48), ausschließen. Die Aktivität von Ras lässt sich, wenn auch nicht vollständig, durch die Imatinib-Gabe reduzieren (s. Abb. 39). Es bleibt natürlich zu bedenken, dass durch den Kaskadenartigen Aufbau des MAPK-Signalweges allein diese Restaktivität ausreichen könnte, um die beobachtete konstitutive Aktivierung von Mek und Erk in KCL22-R auszulösen. Die Analyse der Kinase-Aktivität der Serin-Threonin-Kinasen B-Raf und C-Raf mittels Kinaseassay zeigte schließlich eine eindeutige Überaktivierung vor allem von C-Raf in den resistenten Zellen in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Imatinib im Vergleich zur sensitiven Zelllinie (s. Abb. 40). Mehr noch, in der resistenten

Zelllinie kommt es mit steigender Imatinib-Dosis zu einer Erhöhung der C-Raf-Kinaseaktivität. Damit kann als Ursache für die konstitutive Aktivierung von Mek und Erk in KCL22-R die Überaktivität von C-Raf und B-Raf angenommen werden. Worin deren dauerhafte Aktivität beruht, konnte bislang nicht geklärt werden. Mutationen in einem glycinreichen Bereich nahe der Kinasedomäne bzw. in der AKT-Phosphorylierungsdomäne, die als Ursache für eine konstitutive Aktivierung der Raf-Kinasen beschrieben werden (99, 113), konnten in KCL22-S und -R ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Deregulierung von Raf sind veränderte Protein-Protein-Interaktionen. Dieser wurde mit einer Protein-Protein-Interaktionsstudie nachgegangen und eine Reihe von Interaktionspartnern für C-Raf und B-Raf nachgewiesen. Unter anderem wurde, wie bereits oben beschrieben, HSP90 und Vimentin als bereits beschriebene Interaktionspartner (152, 134) von C-Raf sowohl massenspektrometrisch nach PMF und immunologisch bestätigt (s. Abb. 44). Auf eine mögliche Rolle von HSP90 und Vimentin als Interaktionspartner von C-Raf bei der Imatinib-Resistenz wurde bereits im Abschnitt 7.3.2 eingegangen. Zusätzlich zu HSP90 und Vimentin konnten wir drei bislang nicht beschriebene Interaktionspartner identifizieren, jedoch aufgrund fehlender Antikörper bislang nicht immunologisch verifizieren. Die Carbamoyl-Phosphatase-Synthetase 2/ Aspartat-Carbamoyltransferase/ Dihydroorotase (CAD, SwissProt-Nr.: P27708), eine mutierte Form von Myosin und eine PI3-Kinase wurden als Interaktionspartner von Raf mittels tryptischem Verdau und Datenbankanalyse detektiert (s. Tabelle 7). Die CAD ist ein Multifunktionsprotein, welches drei enzymatische Aktivitäten enthält. CAD steuert die ersten drei Schritte der Pyrimidinsynthese, ihre Expression wird Zellzyklus-abhängig reguliert, um den steigenden Bedarf bei der Zellteilung, vor allem in der S-Phase zu decken (153). Die Aktivität von CAD wird allosterisch durch ein Produkt des Pyrimidinsyntheseweges, UTP, gehemmt. Wird CAD über Erk an Thr456 phosphoryliert, kommt es durch den Verlust dieser *feedback*-Hemmung zum Anstieg der Pyrimidinbiosynthese (154), der MAPK-Signalweg aktiviert also die CAD. Es wäre also denkbar, dass eine Überaktivität bzw. die konstitutive Aktivität des MAPK-Signalweges, die wir in KCL22-R nachweisen konnten, unter anderem über die Aktivierung der Pyrimidinsynthese zu einem Wachstumsvorteil der resistenten Zellen führt. Das nicht-muskuläre schwere Myosin Polypeptid (MYH9, SwissProt-Nr.: P35579) wird neben Leberzellen auch in Leukozyten exprimiert und seine Expression steigt während der myeloiden Differenzierung an (155). In dem MYH9-Gen, welches auf 22q12.3-13.1 liegt, sind eine Reihe von Mutationen bekannt, die mit einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen wie May-Hegglin-, Sebastian- oder Fechtner -Syndrom assoziiert sind (156). Das Hauptkriterium dieser Syndrome ist eine Makrothrombozytopenie (157), die wahrscheinlich durch eine gestörte Reifung der Megakaryozyten (MK), den Vorläufern der Thrombozyten, hervorgerufen wird. Bei der Freisetzung der Thrombozyten aus den MK spielt das nicht-muskuläre Myosin eine wichtige Rolle, weil es dabei zu einer Reorganisation des Zytoskeletts kommt (158). Ist die Myosin-Funktion gestört, kommt es zur Bildung von besonders großen, abnorm geformten Thrombozyten, deren Überlebenszeit verringert ist, wodurch das Blutgerinnungssystem gestört wird. Die gefundene Anhäufung von großen Zellen in histologischen Präparaten der KCL22-R, für die wir zum damaligen Zeitpunkt keine Erklärung hatten, kann im Kontext dieser Daten in einem ganz anderen Licht betrachtet werden. Wenn das Myosin an der Differenzierung von myeloiden Zellen beteiligt ist und in den hier untersuchten Zellen aufgrund einer Mutation nicht mehr funktionsfähig ist, könnte dies einen Mechanismus darstellen, der die

Proliferation von Vorläuferzellen fördert. Allerdings fehlen jegliche Hinweise auf eine Interaktion mit den Raf-Kinasen. Einzig die Regulierung der Motoraktivität von Myosin über die Phosphorylierung durch die Rho-assoziierte Kinase (ROCK) und die Myosin-light-chain-Kinase (MLCK) (158) könnte ein Hinweis auf eine Verknüpfung der beiden Proteine darstellen. Es ist beschrieben, dass eine Inhibition der MLCK bzw. eine Inhibition von Myosin II selbst zu einer deutlichen Reduktion der Erk-Phosphorylierung führt und das als Target der MLCK Raf vermutet wird (159). Es wäre also denkbar, dass die mutierte Form von Myosin nicht in der Lage ist, die Erk-Phosphorylierung zu unterbinden und damit auf einem zusätzlichen Weg zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges beiträgt. Der dritte bislang nicht beschriebene Interaktionspartner ist die PI3-Kinase C2 Beta (SwissProt-Nr.: O00750). Klasse-II-PI3-Kinasen werden unter anderem über Rezeptoren von Wachstumsfaktoren aktiviert, sie werden zu Phosphotyrosin-enthaltenen Signaltransduktionskomplexen rekrutiert (160). Dabei spielt das Molekül Grb2, welches auch mit BCR-ABL interagiert, eine wichtige Rolle, es fungiert als Adaptermolekül zwischen PI3K-C2 $\beta$  und dem EGFR. Über die indirekte Interaktion mit EGFR wird die PI3K aktiviert und kann ihrerseits wiederum eine Reihe von Signalwegen aktivieren, die für die Regulation des Zellzyklus, der Zellmotilität und Viabilität verantwortlich sind (161). Aus den Arbeiten über die PI3K-C2 $\beta$  geht allerdings nicht hervor, ob die Bildung des Komplexes auch zu einer Aktivierung von Grb2 kommt, denn dieses aktiviert über Sos Ras und wäre somit das Verbindungsglied von der PI3K zum MAPK-Signalweg.

Allerdings wurden alle genannten Interaktionspartner sowohl im Lysat von KCL22-S als auch im Lysat von KCL22-R detektiert. Somit ist ein direkter Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Interaktionspartnern und der Deregulation von C- und B-Raf in KCL22-R damit nicht zu erklären. Es bleibt jedoch die Frage, inwieweit quantitative oder qualitative Unterschiede in den Interaktionen Veränderungen in Signaltransduktionsgeschehen der Zelle erzeugen können. Es ist mittels Immunopräzipitation nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, in welchen Mengen bzw. Konzentrationen die Interaktionspartner in der Zelle vorliegen oder ob es Unterschiede in der Dauer der Interaktion gibt.

#### **7.4.2 Die Relevanz des p70-S6K/mTOR Signalweges und PI3-Kinase/AKT Signalweges**

Bei der Analyse der Zellproliferation mittels CASY-Technologie konnte festgestellt werden, dass die Zellen der resistenten Zelllinie durchschnittlich 1  $\mu$ M größer sind als die der sensitiven Zelllinie. Die Zellgröße ist abhängig von verschiedenen Faktoren, unter anderem von metabolischen Faktoren wie Nährstoffzufuhr. Ein wichtiger Signalweg, der das Zellwachstum und darüber auch die Zellproliferation steuert, ist der p70-S6Kinase/mTOR-Signalweg. Die S6-Kinase, welche über verschiedene Faktoren wie IGF, NGF oder IL-3 aktiviert wird, phosphoryliert das pro-apoptotische Molekül BAD, welches dann durch Sequestrierung an 14-3-3-Proteinen inaktiviert wird (56). Der apoptotische Signalweg wird somit unterbrochen und die Zellen wachsen weiter und teilen sich. Daher lag es nahe, die Bedeutung dieses Signalwege für die Imatinib-Resistenz von KCL22-R zu untersuchen. Die Kombination von 0,05  $\mu$ M Rapamycin, einem spezifischen Inhibitor für mTor, mit 1  $\mu$ M Imatinib führte in KCL22-R zu einer effektiven Hemmung der Zellproliferation (s. Abb. 46) und verstärkte in den sensitiven Zellen den Effekt von Imatinib allein (s. Abb. 46). Der Zelldurchmesser sank in den resistenten Zellen um bis zu 2  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 47). Interessant sind auch die Ergebnisse der Western Blot-Analysen über die Phosphorylierung der

verschiedenen Schlüsselproteine nach kombinierter Behandlung mit den Inhibitoren (s. Abb. 48). Sowohl die Blockierung der S6-Kinase als auch die Blockierung von AKT führen vor allem bei KCL22-R zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von Erk. Scheinbar versuchen die Zellen, den Wegfall der Aktivität der einen Proteine durch eine Induktion anderer Proteine auszugleichen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Dynamik im Netzwerk der verschiedenen Signalwege und sind ein weiterer Beweis für die Wichtigkeit des MAPK-Signalweges für die Resistenz gegenüber Imatinib. Anhand der Daten wird auch deutlich, dass die Resistenz auch über den S6-Kinase/mTor-Weg vermittelt werden. Werden BCR-ABL und der S6K-Weg inhibiert, können die Zellen nicht mehr wachsen. Beide Wege einzeln inhibiert, führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferation. Wie auch bei der Inhibition des Erk-Signalweges scheinen die Zellen der KCL22-R zwischen den verschiedenen Wegen wechseln zu können. Ist der eine Weg blockiert, wird automatisch einer der anderen Wege angeschaltet. Wie dieser Wechsel moduliert wird und welche Signalkombination zum Umschalten führt, verstehen wir im Moment noch nicht.

BAD kann aber auch direkt über AKT phosphoryliert werden (s. Einleitung und 52). AKT ist ein wichtiges Substrat der PI3-Kinase, die durch Insulin- und Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wird. Neben BAD sind auch die FOXO-Proteine PI3-Kinase/ABL-Kinase abhängige Targets von AKT. FOXO-Proteine scheinen eine Rolle für die Imatinib-Sensitivität zu spielen. KCL22-Zellen, die dominant-negativ für FOXO sind, sprechen besser auf Imatinib an als Zellen, die WT-FOXO-Proteine exprimieren (162). FOXO-Proteine werden über AKT phosphoryliert, über 14-3-3-Proteine degradiert und somit die Aktivierung von FOXO-Targetgenen, welche Apoptose und Zellzyklusarrest auslösen, verhindert. Daher wurde auch die Bedeutung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges für das Proliferationsverhalten der resistenten Zelllinie untersucht. Die Blockierung des PI3K-AKT-Weges mit verschiedenen Inhibitoren zeigte, dass der Signalweg für die Imatinib-Resistenz eine Rolle spielt. Allerdings sind die Inhibitoren Wortmannin und IL-60 nicht so spezifisch, daher sind die Effekte nicht so eindeutig interpretierbar wie die der anderen verwendeten Inhibitoren für Mek und mTOR. Dass die PI3-Kinasen eine Rolle spielen könnten, zeigen bereits die Daten aus der Raf-Interaktionspartner-Studie (s. 6.4.1, Tabelle 7 und 7.4.1). Dabei konnten wir, wie oben beschrieben zeigen, dass vor allem C-Raf mit der PI3K-C2 $\beta$  interagiert und somit eine Verbindung zwischen den Signalwegen PI3-Kinase und MAPK hergestellt werden konnte. Es besteht also die Möglichkeit, dass BCR-ABL in KCL22-R unter anderem über die Inaktivierung der pro-apoptotischen FOXO-Proteine Zellproliferation fördert. Wird BCR-ABL durch Imatinib inhibiert, kann es trotzdem über alternative Signalwege wie den der PI3-Kinase, der eventuell noch zusätzlich den MAPK-Signalweg durch die Interaktion mit Raf stimuliert, zu einer Inaktivierung von FOXO-Proteinen und somit zur Verhinderung der Apoptose bzw. zum Zellzyklusarrest kommen.

#### **7.4.3 Ist die Imatinib-Resistenz durch parakrine Faktoren vermittelbar?**

Ein weiterer interessanter Gedanke war, dass die Proteine, die zur Imatinib-Resistenz führen, möglicherweise zwar von den Zellen selbst gebildet werden, aber auch in den Extrazellularraum abgegeben werden. Auf diesen auto- oder parakrinen Weg könnten sie dann wiederum auf sich selbst oder aber auf Nachbarzellen wirken. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde Medium, in welchem die resistenten Zellen kultiviert wurden (= konditioniertes Medium), gewonnen, steril filtriert und auf die sensitiven Zellen gegeben. Nach einer gewissen „Einwirkzeit“ wurden die sensitiven Zellen mit Imatinib behandelt und es konnte tatsächlich ein Sensitivitätsverlust gegenüber

dem Tyrosinkinaseinhibitor von ca. 20 % nachgewiesen werden (s. Abb. 50). Ein Effekt, der durch möglicherweise sezernierte Wachstumsfaktoren hervorgerufen wurde, kann hier als Ursache ausgeschlossen werden. Sensitive Zellen, die nur in konditioniertem Medium kultiviert wurden, zeigten keinen Wachstumsvorteil gegenüber solchen, die in normalem Medium gewachsen sind. Auch dass bei den resistenten Zellen kaum ein Unterschied zwischen Imatinib-behandelten Zellen mit und ohne konditioniertes Medium zu beobachten war, kann als Ausschluss für das Wirken von Wachstumsfaktoren gewertet werden.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass der Zelldurchmesser der sensitiven Zellen im Durchschnitt um 5 % zunimmt, wenn man die Zellen mit konditioniertem Medium der resistenten Zellen und Imatinib behandelt (s. Abb. 51). Anders herum betrachtet könnte man auch aussagen, dass der Effekt von Imatinib auf die Zellgröße der sensitiven Zellen durch die Verwendung von konditioniertem Medium abgeschwächt wird. Bei den resistenten Zellen konnte nur ein geringer Einfluss des konditionierten Mediums von  $< 1\%$  gezeigt werden. Welche Substanzen diese Effekte verursachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, ist aber ein interessantes Untersuchungsfeld für weiterführende Analysen (s. Ausblick). Es gibt bislang noch keine Untersuchungen anhand von konditioniertem Medium. Möglicherweise besteht jedoch ein Zusammenhang zum EGFR-Signalweg. Der EGF-Rezeptor ist eine Transmembranrezeptor-tyrosinkinase, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann. Wie in der Arbeit von Adjei, 2006 beschrieben (163), kann über den EGFR sowohl die PI3-Kinase als auch MAPK aktiviert werden. Allerdings erfolgt die MAPK-Aktivierung Ras-abhängig und scheidet dafür als Ursache für die Resistenzvermittlung aus, da wir zeigen konnten, dass die Aktivität von Ras Imatinib-sensitiv ist (s. Abb. 39). Der EGFR aktiviert noch eine dritte Gruppe von Kinasen, die sogenannten *mixed linkage* Kinasen (MLKs). Über diese MLK wird Mek Raf-unabhängig direkt aktiviert, jedoch folgt der Mek-Phosphorylierung keine Aktivierung von Erk. Mehr noch, scheint Erk in Zellen, die aktives MLK3 exprimieren, resistent für die Aktivierung über Wachstumsfaktoren zu sein. Diese Resistenz lässt sich über die Inhibition des JNK-Signalweges wieder aufheben (164). Es besteht also eine negative Korrelation zwischen der Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges, der TNF-gesteuert Zellwachstum blockiert und der Aktivierung von Erk, welches die Zellteilung eher fördert. Wie die Aktivierung dieser beiden Signalwege in den Kontext der bisher ermittelten Daten passt, bleibt im Moment noch offen. Als kontrovers ist zu sehen, dass in KCL22-R schon bei Raf eine konstitutive Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Besteht eine Verbindung zu EGFR über MLK, sollte Mek Raf-unabhängig aktiviert werden. Möglicherweise spielt noch ein weiterer Signalweg eine Rolle, der Raf ohne Beteiligung der MLKs aktiviert. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die kombinierte Behandlung mit EGFR-Inhibitoren, CI-1040 und Imatinib die Zellproliferation von KCL22-R reduzieren kann.

## 7.5 Zusammenfassung der beteiligten Signalwege im Kontext der chromosomalen Veränderungen

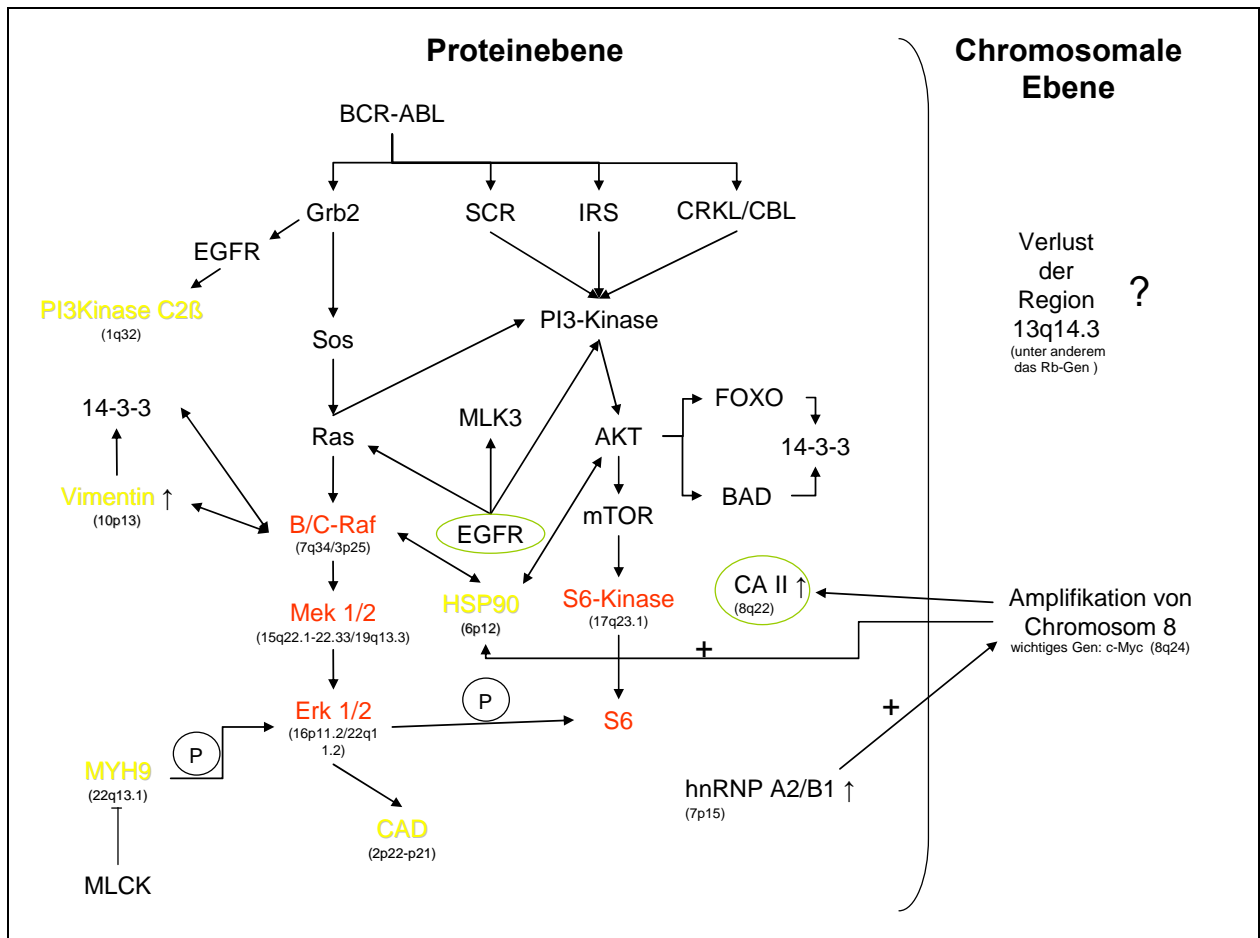


Abb. 54: Übersicht der möglichen in die Resistenzentwicklung von KCL22-R involvierte Proteine, Signalwege und chromosomale Veränderungen. Farbcodierung: rot = überaktive Proteine in KCL22-R, gelb = detektierte Interaktionspartner von Raf, grün = Vermittler möglicher extrazellulärer Komponenten. ↑↓ = Proteinexpression hoch- oder runterreguliert gefunden, + = Aktivierung der Expression/Aktivität selbst, (P) = Phosphorylierung des Zielproteins. Genauere Erläuterungen im Text.

Die Zelllinie KCL22-R ist resistent gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib. Es besteht jedoch keine Überexpression von BCR-ABL, auch Mutationen in der ATP-Bindestelle von BCR-ABL konnten wir als Resistenzursache ausschließen. Imatinib ist also in der Lage, die Autophosphorylierung von BCR-ABL in KCL22-R zu unterbinden. Trotzdem können die Zellen der Zelllinie weiter proliferieren, zeigen sogar ein vermehrtes Wachstum bzw. verringerte Apoptose in Anwesenheit von Imatinib. Die Zellen scheinen also eine Möglichkeit gefunden zu haben, die Funktion von BCR-ABL durch alternative Signalwege zu ersetzen. Bei der Suche nach der Ursache der Imatinib-Resistenz wurde eine eher ungewöhnliche Kombination aus zytogenetischen und proteomischen Methoden verwendet, diese Zusammenfassung versucht, die Daten beider Untersuchungsteile miteinander zu verknüpfen. Wir konnten zeigen, dass die resistente Zelllinie eine Tetrasomie 8 trägt, was zur Amplifikation des Myc-Gens führen könnte. Auf Chromosom 8q22 liegt außerdem die CA II, was deren Überexpression in KCL22-R erklären könnte. Weiterhin wurde eine Translokation 6;13 gefunden, die zum teilweisen Verlust eines q-Arm von Chromosom 13 führt und somit zu einer Monosomie in diesem Bereich. Jedoch ist keines der Gene der gefundenen



differentiell exprimierten oder konstitutiv aktiven Proteine in dieser chromosomalen Region lokalisiert.

Mithilfe spezifischer Inhibitoren konnten wir nachweisen, dass der MAPK-Signalweg in KCL22-R konstitutiv aktiv ist, beginnend auf der Ebene von Raf, während Ras als Startpunkt dieses Signalweges noch Imatinib-sensitiv ist. Mutationen in Bereichen, die bekanntermaßen zu einer dauerhaften Aktivierung von Raf führen, können wir als Ursache ausschließen. Der Möglichkeit der Deregulation durch veränderte Proteininteraktionen wurde mithilfe eines Interaktionspartnerassays nachgegangen. Es zeigte sich, dass C-Raf mit dem Chaperon HSP90 interagiert, welches möglicherweise dessen Stabilität und damit auch Aktivität verlängern kann. HSP90 selbst wird über c-Myc aktiviert, was einen Zusammenhang zu den zytogenetischen Daten darstellt. Außerdem aktiviert HSP90 AKT, somit kann eine Verbindung vom MAPK- zum PI3-Kinase-Signalweg konstruiert werden. Eine weitere Interaktion wurde mit dem Intermediärfilamentprotein Vimentin nachgewiesen, welches, wenn es phosphoryliert ist, an 14-3-3-Proteine bindet und somit andere Targetproteine von 14-3-3 verdrängt. Eines dieser Targetproteine ist auch Raf, welches durch die Bindung an 14-3-3 aktiviert werden kann. Die Expression von Vimentin ist in KCL22-R im Vergleich zu KCL22-S reduziert, somit wäre weniger Vimentin vorhanden, welches die 14-3-3-Proteine blockieren würde und im Gegenzug könnte vermehrt Raf gebunden und aktiviert werden. Ein drittes Protein, welches als Interaktionspartner von Raf detektiert wurde, ist das CAD-Protein. Laut Literaturquellen ist zwar keine direkte Interaktion von Raf und CAD beschrieben, allerdings ist bekannt, dass Erk CAD phosphoryliert und so zu einer gesteigerten Pyrimidinbiosynthese und somit zu einem erhöhten Zellwachstum führt. CAD ist daher als indirekter Interaktionspartner von Raf zu werten und wohl eher ein Effektormolekül, welches durch die dauerhafte Aktivierung des MAPK-Signalweges Zellproliferation fördert. Die Relevanz des S6-Kinase/mTOR-Signalweges für die Erlangung der Imatinib-Resistenz konnte durch die Verwendung des mTOR-Inhibitors Rapamycin in Kombination mit Imatinib gezeigt werden. Jedoch war der Effekt von Inhibitoren, welche die übergeordneten Moleküle dieses Signalweges PI3-Kinase und AKT hemmen, nicht so deutlich. Es ist beschrieben, dass der PI3-Kinase/AKT-Signalweg zwar der prädominante übergeordnete Signalweg für die Aktivierung der S6-Kinase ist, es aber durchaus auch über Erk zu einer Phosphorylierung der S6-Kinase kommen kann. Als weiterer Interaktionspartner von Raf wurde das nicht-muskuläre Myosin 9 gefunden, welches wiederum zu einer Phosphorylierung von Erk führen kann. Auch die Aktivierung verschiedener Signalwege durch extrazelluläre Stimuli, vermittelt z.B. durch den EGF-Rezeptor scheint eine Rolle für die Resistenzentwicklung zu spielen. Auch über diesen Weg kann der MAPK-Signalweg angeschaltet werden, denn unter anderem über MLK kann es zur Aktivierung von Mek kommen. Die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges scheint sich also in KCL22-R als Hauptursache der Imatinib-Resistenz zu manifestieren. Es bleibt jedoch weiterhin offen, über welche Moleküle das Umschalten zwischen den BCR-ABL-gesteuerten Signalwegen und den alternativen Wegen modulieren. Fraglich ist, ob es eine Art Feedback-Aktivierung gibt, die bei fehlendem BCR-ABL-Signalling dann alternative Signalwege anschalten, die schlussendlich zur Bildung der selben Moleküle führen wie ehemals über BCR-ABL und somit zur ungehinderten Zellproliferation und zur Vermeidung von Apoptose.

## 8 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass sich die resistente und die sensitive KCL22-Zelllinie auf Proteinebene in einer Reihe von Merkmalen unterscheiden. Durch die Wahl der Versuchsbedingungen und der Verwendung von heterogenen Zelllinien als Ausgangsmaterial wurde der Umfang und die Signifikanz an gewonnenen Daten eingeschränkt. Um ein möglichst vollständiges Bild aller Proteinexpressionsunterschiede zwischen den beiden Zelllinien sowie von den Subklonen der resistenten Zelllinie darzustellen, ist es notwendig, Einzelklone als Ausgangsmaterial zu verwenden. Außerdem müssten verschiedene Lyse-, Fraktionierungs- und Analysemethoden so kombiniert werden, dass Proteine mit unterschiedlichen Größen, biochemischen Eigenschaften und Vorkommen in der Zelle erfasst werden können. Das Zusammenwirken und die Bedeutung der gefundenen Marker bei der Entwicklung der initialen Resistenz kann, wie auch schon in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des MAPK-Signalweges gezeigt, über die Verwendung von Inhibitoren/Aktivatoren von Molekülen oder von siRNA-Systemen geklärt werden. Die Analyse von Resistenzmechanismen anhand von in vitro-Systemen ist insofern kritisch zu sehen, dass sicherlich nur ein kleiner Ausschnitt der möglichen Ursachen für die Resistenz betrachtet werden kann. Daher ist für den Nachweis der klinischen Relevanz der differentiell exprimierten oder phosphorylierten Proteine eine abschließende Untersuchung von Patientenmaterial zwingend. Dabei ist es wahrscheinlich, dass bestimmte gefundene Marker nur bei einem Teil der Patienten nachgewiesen werden können, da bei Patientenmaterial eine viel höhere Variabilität zu erwarten ist als bei Zelllinien. Daher ist es für die Validierung mit Patientenproben besonders wichtig, klinische Parameter der Patienten wie Imatinib-Ansprechen, Mutation im BCR-ABL-Gen oder BCR-ABL-Überexpression zu kennen. Fernziel der gesamten Charakterisierung ist die Entdeckung eines neuen Targets für Therapeutika.

Für einige bereits in dieser Arbeit gefundenen differentiell exprimierten Proteinen steht der Nachweis der funktionellen Bedeutung für die Resistenzentwicklung noch aus. Interessant erscheint dabei vor allem die Überprüfung der Hypothese, ob eine Vimentin-Überexpression in der sensitiven Zelllinie zu einer reduzierter C-Raf-Aktivität führen kann. Durch die Verwendung des Phosphatase-Inhibitors Calyculin-A, welcher die Phosphorylierung von Vimentin fördert, könnte überprüft werden, ob eine verstärkte Bindung von Vimentin an 14-3-3-Proteine zu einer vermehrten Aktivierung von Raf führt.

Wir konnten zeigen, dass HSP90 eine Interaktion mit C-Raf eingeht. HSP90 als Chaperon wirkt stabilisierend und könnte somit die Verweildauer und darüber die Aktivität von C-Raf in KCL22-R verlängern. Durch die Verwendung von Geldanamycin kann die Stabilität von HSP90 verringert und somit eine Bindung an Targetproteine reduziert werden. Durch die kombinierte Gabe von Geldanamycin und Imatinib könnte geklärt werden, ob HSP90 einen Einfluss auf die erhöhte C-Raf-Aktivität in KCL22-R hat und stellt somit möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie von Imatinib-resistenten CML-Patienten dar.

Weiterhin steht die Frage im Raum, ob die Imatinib-Resistenz durch parakrine oder autokrine Faktoren vermittelt wird. Dazu konnten in Vorexperimenten bereits Hinweise gefunden werden.

Sensitive Zellen, die mit Zellkulturüberständen der resistenten Zellen kultiviert wurden, zeigten eine abgeschwächte Reaktion auf die Imatinib-Therapie im Vergleich zu konventionell kultivierten Zellen. Interessant wäre eine vergleichende massenspektrometrische sowie Gel-basierte Analyse der Zellkulturüberstände (konditioniertes Medium) von KCL22-S und -R, um Aufschluss über die beteiligten Proteine zu liefern. Allerdings stellt sich die Analyse von Mediumsbestandteilen aufgrund des hohen Anteils an hoch-abundanten Proteinen wie Albumin oder Immunglobuline schwierig dar. Daher sind aufwendige Aufreinigungsschritte nötig, um die differentiell exprimierten Proteine nachweisen zu können und es bleibt fraglich, ob der eher geringe beobachtete Effekt des Mediumstransfers von 10-20 % einen solchen Aufwand rechtfertigt.

Die Zellen der resistenten Zelllinie sind durchschnittlich 1  $\mu\text{m}$  größer als die der sensitiven Zelllinie. Zellgröße, Wachstum und Teilung werden unter anderem durch die Signalwege S6-Kinase/mTOR und AKT moduliert. Wir konnten bereits zeigen, dass eine Inhibition der Signalwege mit Wortmannin bzw. Rapamycin in Kombination mit der Blockierung von BCR-ABL durch Imatinib die Sensitivität der resistenten Zelllinie gegenüber Imatinib erhöht und einen Proliferationsstop bewirkt. Es ist bis jetzt jedoch noch nicht geklärt, ob eine Überaktivität einer der beteiligten Kinasen vorliegt und wenn ja, wodurch diese verursacht wird. Die Aktivität entscheidender Kinasen könnte durch Western Blots (Akt, p70-S6K) und radioaktiven Aktivitätsassays aus Immunpräzipitaten ermittelt werden (p70-S6K). Diese Versuche würden Aufschluss über eine mögliche Rolle des PI3K/Akt/mTOR/S6K Signalweges bei der Resistenz-Erlangung geben.

## 9 Verzeichnisse

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

1DE	Eindimensionale Gelelektrophorese
2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AUC	Area under Curve
CI	CI-1040
CML	Chronische myeloische Leukämie
Co/Ko	Kontrolle
der	derivativ
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
IM	Imatinib
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
KM	konditioniertes Medium
LOH	loss-of-heterozygosity
MCB	Multicolor-Banding
MG	Molekulargewicht
MS	mass spectrometry, Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NM	Normalmedium
OT	Objektträger
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	Petide Mass Fingerprint
Rapa	Rapamycin
ROC	Receiver operating characteristic
SELDI-TOF	Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation Time of Flight
SG	Spectrum Green
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SO	Spectrum Orange
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

### 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, es entsteht das sogenannte Philadelphia-Chromosom mit der BCR-ABL-Genfusion und das reziproke derivative Chromosom 9 mit der ABL-BCR-Genfusion ( <a href="http://www.onkodin.de">www.onkodin.de</a> ).....	8
Abb. 2: Bruchpunkte in den Genen BCR und ABL sowie entstehende Fusionsgene (aus Wang et al. 5). ....	9
Abb. 3: Domänen von BCR (24). Abkürzungen sind im Text beschrieben. ....	9
Abb. 4: Domänen von ABL (24). Erklärung der Abkürzungen im Text. ....	10
Abb. 5: ABL-Aktivierung während des Zellzyklus (24).....	10
Abb. 6: Domänen des BCR-ABL-Fusionsgens (24). ....	11
Abb. 7 links: Signalwege, die über Ras gesteuert werden (36). Rechts: Ras-vermittelter Zellzyklus-Arrest (47). ....	12
Abb. 8: Aktivierung des PI3-Kinase-Weges über BCR-ABL (52). A: Klassische Aktivierung der PI3-Kinase über den CRKL/CBL-Komplex. B: Weitere mögliche Mechanismen über Scr, Ras und IRS-1 (Insulin receptor substrate-1). ....	13
Abb. 9: Steuerung des AKT/S6-Kinase/mTOR-Weges (52). Erläuterungen im Text.....	14
Abb. 10: BCR-ABL-assozierte Signalwege (24).....	14
Abb. 11: Strukturformel von Imatinib-Mesylate ( <a href="http://www.wikipedia.org">www.wikipedia.org</a> ).....	15
Abb. 12: Imatinib-Wirkung durch die kompetitive Bindung an die ATP-Bindestelle von BCR-ABL (74). ....	15
Abb. 13: Zellproliferation von KCL22-S in An- und Abwesenheit des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib. Die sensitive Zelllinie kann unter 1 µM Imatinib (+IM) im Vergleich zur Kontrolle (Co) nicht wachsen.....	42
Abb. 14: Zellproliferation von KCL22-R in An- und Abwesenheit des BCR-ABL-Inhibitors Imatinib. Bei der resistenten Zelllinie ist kaum ein Unterschied zwischen behandelter (IM) und unbehandelter Probe (Co) messbar.....	43
Abb. 15: Apoptosemessung nach Imatinib-Behandlung: Die sensitiven Zellen zeigen einen deutlich messbaren Anstieg der Apoptose um ca. 50 %, bei den resistenten Zellen ist sogar ein leichter Rückgang der Apoptose nach Imatinibgabe zu beobachten. ....	43

Abb. 16: mRNA-Expressionsniveau von BCR-ABL im Vergleich zum Referenzgen G6PDH. KCL22-R zeigt ein leicht erhöhtes Level im Vergleich zur sensitiven Zelllinie. ....	44
Abb. 17: Western Blot zur Bestimmung der Menge an phosphoryliertem Abl. Bereits 0,1-1,0 $\mu$ M Imatinib führen bei beiden Zelllinien zu einer Verminderung der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Co).....	44
Abb. 18: 24-Farben-FISH der Zelllinie KCL22-S (A) und -R (B) sowie die Farbcodierung für die einzelnen Chromosomen (C).....	46
Abb. 19: (A) Normales Chromosom 6.....	47
(B) Chromosom der(6)t(6;13) .....	47
Abb. 20: (A) Normales Chromosom 13.....	47
(B) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13qter).....	47
(C) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1:: 13q12→13q22) .....	47
(D) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13q14) .....	47
(E) der(6)t(6;13)(6qter→6p11.1::13q12→13q13) .....	47
(F) der(6)t(3;13;6)(6qter→6p11.1::13q12→13q14::3?) .....	47
Abb. 21: Anteil der Zellen mit einer Disomie für den Chromosomenabschnitt 13q14, ermittelt mit Interphase-FISH. R+ = dauerhafte Behandlung mit 1 $\mu$ M Imatinib, R- = Imatinibtherapie wurde unterbrochen, R++ = Imatinibtherapie wurde nach Unterbrechung für einige Tage fortgesetzt. 48	48
Abb. 22: Repräsentative Metaphaseplatten von Zellen mit einer Disomie (A) und Monosomie für 13q14 (B) mit einer FISH-Markierung für Centromer 6 (cep 6, SG) und LSI13 (SO). Die Zellen mit der Monosomie für 13q14 weisen nur ein Signal für die Targetsequenz am intakten Chromosom 13 auf, am derivativen Chromosom 6 (Pfeil) fehlt die Markierung. ....	48
Abb. 23: Gesamtübersicht über alle chromosomalen Veränderungen des Klons 4 von KCL22-R nach SNP-Analyse. Auf der X-Achse sind die Chromosomen von 1-22 sowie X aufgetragen. Im oberen Teil der Abbildung sind Zugewinne und Verluste dargestellt, im unteren Drittel wurden LOH-Ereignisse ( <i>loss-of-heterozygosity</i> ) detektiert. Erklärungen im Text.....	49
Abb. 24: Gesamtübersicht über alle chromosomalen Veränderungen des Klons 8 nach SNP-Analyse. Für Beschreibung der Achsen s. Abb. 23, Erklärungen im Text. ....	50
Abb. 25: SNP-Analyse von Chromosom 13. Unten ist der untersuchte Bereich des Chromosoms dargestellt (grün-schwarz), darüber sind Zugewinne und Verluste sowie daraus entstehende LOH dargestellt. Klon 4 wies einen Verlust eines 82 MB großen DNA-Abschnitts beginnend ab 13q13.1 auf, was mit einer Monosomie für 13q14 einhergeht. ....	50
Abb. 26: SNP-Analyse von Chromosom 13. Für Beschreibung der Achsen s. Abb. 26. In Klon 8 konnte eine Verlust von 60,2 MB nachgewiesen werden, Bruchpunkt war hier der Bereich 13q21.1, damit ist dieser Klon für den Bereich 13q14 disom. ....	51
Abb. 27: Repräsentatives SELDI-Spektrum zweier differentiell exprimierter Peaks. (A) Protein oder Peptid mit ca. 3673 Da, in KCL22-S ca. 7-fach höher exprimiert als in KCL22-R. (B) Protein oder Peptid mit ca. 7482 Da, in KCL22-R ca. 6-fach höher exprimiert als in KCL22-S. ....	52
Abb. 28: Darstellung der Expressionsunterschiede mittels ClusterBlot-Analyse. Oben: Verteilung der Expression des Proteins mit 3673 Da in den 11 biologischen Replikaten. Unten: Verteilung der Expression des Proteins mit 7482 Da in den 11 biologischen Replikaten. ....	53
Abb. 29: Relative Expression von RAB7B zum Referenzgen G6PDH in den Zelllinien KCL22-S und -R mit und ohne Imatinib-Behandlung. Die resistente Zelllinie zeigte sowohl in der Kontrollprobe als auch nach Behandlung mit 1 $\mu$ M ein deutlich höheres Expressionsniveau als die sensitive Zelllinie.....	54
Abb. 30: Repräsentatives Gelbild der fraktionierten Proben mit Banden, für die Kandidaten identifiziert werden konnten, Liste s. Anhang, Tab. 12....	55
Abb. 31: 2DE von KCL22-S, zwei identifizierte differentiell exprimierte Proteine sind mit Pfeilen markiert.....	56
Abb. 32: 2DE von KCL22-R, drei identifizierte differentiell exprimierte Proteine sind mit Pfeilen markiert. ....	56
Abb. 33: Bestätigung der differentiellen Expression von HSP27 in KCL22-S. Nach Imatinibgabe (1 $\mu$ M) sinkt das Expressionsniveau deutlich. ....	57
Abb. 34: Vimentin ist in der sensitiven Zelllinie deutlich stärker exprimiert als in der resistenten. Ein Zusammenhang mit der Imatinib-Therapie wurde hier nicht untersucht. ....	57
Abb. 35: Die Enolase ist in den resistenten Zellen stärker exprimiert als in den sensitiven. Mit steigenden Imatinib-Konzentrationen (IM, 1-10 $\mu$ M) nimmt auch die Expression der Enolase zu. ....	57
Abb. 36: Zellproliferation nach Kombinationstherapie mit 0,1 $\mu$ M CI-1040 und 1 $\mu$ M Imatinib. Die sensitive Zelllinie zeigte keine Reaktion auf CI-1040 allein (CI), jedoch bei Imatinib-Gabe (IM) und der Kombination von CI-1040 und Imatinib (CI/IM) konnten die Zellen nicht mehr wachsen. ....	58
Abb. 37: Zellproliferation nach Kombinationstherapie mit 0,1 $\mu$ M CI-1040 und 1 $\mu$ M Imatinib. Die resistente Zelllinie zeigte nur bei der Kombinationstherapie (CI/IM) einen Proliferationsstop im Vergleich zur Kontrolle (Co). ....	59
Abb. 38: Caspase3/7-Aktivität der Zellen der sensitiven und der resistenten Zelllinie nach Behandlung mit Imatinib (IM) und CI-1040 (CI) sowie in Kombination (IM+CI). Die Apoptoserate der resistenten Zelllinie bleibt bei allen Ansätzen unbeeinflusst, während die sensitiven Zellen einen Anstieg der Apoptose zeigen, am stärksten bei der Kombinationstherapie. ....	59
Abb. 39: Nachweis von aktivem Ras, die Mengen sind bei beiden Zelllinien vergleichbar. Als Referenz wurde Gesamt-Ras verwendet, die verwendeten Proteinmengen schwanken nur wenig. Co = Kontrolle, IM = mit 1 $\mu$ M Imatinib behandelt.....	60
Abb. 40 links: Durchschnittliche Kinaseaktivität von C-Raf in Gegenwart von 1 $\mu$ M Imatinib in sensitiver und resistenter Zelllinie. Rechts: Abhängigkeit der Kinaseaktivität von der Imatinib-Konzentration im Versuchsansatz. Die Kinaseaktivität von C-Raf reduziert sich in der KCL22-S auf 60 %, während die Zellen der resistenten Zelllinie einen Anstieg der Kinaseaktivität nach Imatinib-Gabe zeigen. ....	60
Abb. 41: C-Raf-vermittelte Phosphorylierung des Substrats MBP, sichtbar gemacht durch den Einbau von radioaktivem ATP ( $[\gamma^{35}\text{P}]\text{-ATP}$ ). Imatinib blockiert bei KCL22-S bereits bei 1 $\mu$ M die C-Raf-Aktivität, während bei KCL22-R die C-Raf-Aktivität bei zunehmender Imatinib-Dosis sogar noch steigt. Im unteren Teil der Abbildung findet sich der Western Blot gegen C-Raf den selben Proben, um zu zeigen, dass identische Proteinmengen für das Kinase-Assay verwendet wurden. ....	61

Abb. 42: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Erk (Western Blot gegen Phospho-Erk). Die resistenten Zellen zeigten eine deutlich höhere Konzentration an phosphoryliertem Erk als die sensitiven Zellen. Die Behandlung mit Imatinib führte bei KCL22R nicht zur Löschung dieser Phosphorylierung.....	61
Abb. 43: mRNA-Expressionsniveau von B-Raf, C-Raf und Erk. Alle drei Kinasen waren in der resistenten Zelllinie nur geringfügig stärker exprimiert als in der sensitiven Zelllinie.....	62
Abb. 44: Immunologische Verifizierung der massenspektrometrisch identifizierten Interaktionspartner von B-Raf und C-Raf. (A): Immunopräzipitation (IP) und anschließender Western Blot mit B-/C-Raf-AK. (B): IP mit B-/C-Raf-AK, Blot gegen Vimentin. (C): IP mit C-Raf-AK, Blot gegen HSP90. M = Marker.....	63
Abb. 45: Zellproliferation von KCL22-S unter Behandlung mit dem S6-Kinase-Hemmer Rapamycin (Rapa). Selbst bei geringen Konzentrationen (0,05 µM) kam es zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die Kombinationstherapie mit Imatinib (Rapa+IM) konnte diesen Effekt noch verstärken. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.....	63
Abb. 46: Zellproliferation von KCL22-R nach Kombinationstherapie mit Rapamycin und Imatinib. Rapamycin (Rapa) allein hatte kaum messbaren Einfluss auf die Proliferation, jedoch bei gleichzeitiger Gabe mit Imatinib (Rapa+IM) können die Zellen nicht mehr wachsen. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.....	64
Abb. 47: Einfluss der Therapeutika auf den Zelldurchmesser. Imatinib und Rapamycin (Rapa+IM) in Kombination führten sowohl bei sensibler und resistenter Zelllinie zu einer Abnahme des Zelldurchmessers um ca. 1-2 µm. Die Zellen der resistenten Zelllinie zeigten durchschnittlich einen 1,5 µm-größeren Durchmesser als die Zellen der sensitiven Zelllinie. Ko = Kontrolle, IM = Imatinib.....	64
Abb. 48: Einfluss der Kombination der verschiedenen Inhibitoren auf die Phosphorylierung von BCR-ABL, AKT und Erk bei KCL22-S und -R. In Tabelle: Auftragsschema der verwendeten Kombinationen, Lysate der KCL22-S in ungerade nummerierten Spuren, die der KCL22-R in gerade nummerierte Spuren.....	65
Abb. 49: Messung der Apoptose nach Kombination der verschiedenen Inhibitoren in KCL22-S und -R. Durch die Kombination aller Inhibitoren steigt die Apoptose in sensibler und resistenter Zelllinie deutlich an. IM=Imatinib, R=Rapamycin, L=LY294002, C=CI-1040.....	66
Abb. 50: Zellzahlentwicklung in % der Kontrolle. Imatinib wirkt bei den sensitiven Zellen in konditioniertem Medium (KM) weniger stark als bei den Zellen in Normalmedium (NM). Die beiden Ansätze der resistenten Zellen unterscheiden sich kaum.....	67
Abb. 51: Veränderungen des Zelldurchmessers von sensibler und resistenter Zelllinie in konditioniertem und Normalmedium nach Imatinib-Behandlung in % der Kontrolle. Die sensitiven Zellen in Normalmedium weisen einen deutlich kleineren Durchmesser auf als in konditioniertem Medium, während bei den resistenten Zellen nur ein geringer Unterschied zu beobachten ist.....	67
Abb. 52: Hypothetische Aktivierung des Ras-Signalweges mit und ohne Imatinib-Behandlung. Durch eine konstitutive Aktivierung von Raf könnte Imatinib bei KCL22-R anti-apoptotisch wirken.....	70
Abb. 53: Modell zur Erklärung der Überexpression von Vimentin den sensitiven Zellen.....	74
Abb. 54: Übersicht der möglichen in die Resistenzentwicklung von KCL22-R involvierte Proteine, Signalwege und chromosomale Veränderungen. Farbcodierung: rot = überaktive Proteine in KCL22-R, gelb = detektierte Interaktionspartner von Raf, grün = Vermittler möglicher extrazellulärer Komponenten. ↑↓ = Proteinexpression hoch- oder runterreguliert gefunden, + = Aktivierung der Expression/Aktivität selbst, (P) = Phosphorylierung des Zielproteins. Genauere Erläuterungen im Text.....	83

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper.....	22
Tabelle 2: Verwendete Vektoren und Bakterienstämme.....	24
Tabelle 3: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die quantitative PCR (in Klammern Literaturquelle für Primersequenzen und PCR-Bedingungen, sofern nicht selbst etabliert).....	30
Tabelle 4: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für die Sequenzierung (in Klammern: Literaturquelle für Primer und PCR-Bedingungen).....	32
Tabelle 5: SELDI-Peaks in den verschiedenen pI-Fractionen (F) nach Analyse auf IMAC-Kupfer.....	52
Tabelle 6: Liste der häufig mittels 2DE identifizierten differentiell exprimierten Proteine.....	55
Tabelle 7: Identifizierte Interaktionspartner von B-Raf und C-Raf.....	62
Tabelle 8: Ergebnisse der Apoptose-Messung.....	101
Tabelle 9: Relative Expression von RAB7B in KCL22-S und -R mit und ohne Imatinib-Behandlung.....	101
Tabelle 10: Expression von RAB7B zu Aktin bzw. G6PDH in unterschiedlichen Gruppen von Patienten.....	102
Tabelle 11: Zusammensetzung der weiterkultivierten Einzelklone hinsichtlich Monosomie/ Disomie 13q14.....	102
Tabelle 12: Identifizierte Proteine aus 1DE/QHyperD-Aufreinigung.....	102
Tabelle 13: Übersicht aller mittels 2DE identifizierten differentiell exprimierten Proteine.....	103
Tabelle 14: Zellproliferation von KCL22-S und -R nach Kombinationstherapie mit CI-10 und Imatinib bestimmt mittels CASY.....	104
Tabelle 15: Messung der Caspase3/7-Aktivität nach Kombinationstherapie mit Imatinib (IM) und CI-1040 (CI) in KCL22-S und -R.....	104
Tabelle 16: mRNA-Expressionsniveau von B-Raf, C-Raf und Erk im Vergleich zu β-Aktin.....	104
Tabelle 17: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Kombinationstherapie mit Imatinib und Rapamycin.....	104
Tabelle 18: Apoptose nach Kombination der verschiedenen Inhibitoren (in % der Kontrolle).....	105
Tabelle 19: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Imatinib-Gabe in Normalmedium (NM) und konditioniertem Medium (KM), gemessene Werte.....	105
Tabelle 20: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Imatinib-Gabe in Normalmedium (NM) und konditioniertem Medium (KM) als % der Kontrolle.....	105
Tabelle 21: Gene in der Region 13q13.1-13q21.1.....	106

## 9.4 Literaturverzeichnis

- (1) Hochhaus A, Muller MC, Hehlmann R. Diagnostik und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie. *Der Onkologe* 2002; 7(8):693-707.
- (2) Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243(5405):290-293.
- (3) Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;(132):1497.
- (4) Marley SB, Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109(1):13-25.
- (5) Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 32(2):97-111.
- (6) Branford, Hughes, Rudzki. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British Journal of Haematology* 1999; 107(3):587-599.
- (7) Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002; 16(1):53-59.
- (8) Loncarevic IF, Romer J, Starke H, Heller A, Bleck C, Ziegler M, Fiedler W, Liehr T, Clement JH, Claussen U. Heterogenic molecular basis for loss of *ABL1-BCR* transcription: Deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in *BCR-ABL1*-positive chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; *Genes Chromosomes Cancer* 34:193-200.
- (9) Tura S, Baccarani M, Corbelli G. Staging of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1981; 47(1):105-119.
- (10) Cervantes F, Rozman C. A multivariate analysis of prognostic factors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1982; 60(6):1298-1304.
- (11) Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 1988; 25(1):49-61.
- (12) Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(11):850-858.
- (13) Kantarjian HM, Keating MJ, Smith TL, Talpaz M, McCredie KB. Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia. *Am J Med* 1990; 88(1):1-8.
- (14) Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18(3):569-84, viii.
- (15) Prakash O, Yunis JJ. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11(4):361-367.
- (16) Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giral S, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology* 2000; 2000(1):90-109.
- (17) Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol* 1995; 89(3):546-554.
- (18) Heisterkamp N, Knoppel E, Groffen J. The first BCR gene intron contains breakpoints in Philadelphia chromosome positive leukemia. *Nucl Acids Res* 1988; 16(21):10069-10081.
- (19) Laurent E, Talpaz M, Wetzler M, Kurzrock R. Cytoplasmic and nuclear localization of the 130 and 160 kDa Bcr proteins. *Leukemia* 2000; 14(11):1892-1897.
- (20) Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(6):2343-2355.
- (21) Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, . BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993; 75(1):175-185.
- (22) Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96(10):3343-3356.
- (23) Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 1994; 266(5182):129-133.
- (24) Smith DL, Burthem J, Whetton AD. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert Rev Mol Med* 2003; 2003:1-27.
- (25) Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 1989; 58(4):669-678.

- (26) Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; 373(6515):573-580.
- (27) Ren R, Ye ZS, Baltimore D. Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* 1994; 8(7):783-795.
- (28) Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 1992; 256(5055):382-385.
- (29) Goga A, Liu X, Hambuch TM, Senechal K, Major E, Berk AJ, Witte ON, Sawyers CL. p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene* 1995; 11(4):791-799.
- (30) McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* 1993; 12(4):1533-1546.
- (31) Wang JY. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3(1):35-43.
- (32) Duyster J, Baskaran R, Wang JY. Src Homology 2 Domain as a Specificity Determinant in the c-Abl-Mediated Tyrosine Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxyl-Terminal Repeated Domain. *PNAS* 1995; 92(5):1555-1559.
- (33) Kharbanda S, Bharti A, Pei D, Wang J, Pandey P, Ren R, Weichselbaum R, Walsh CT, Kufe D. The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of  $\alpha$ SHPTP1. *PNAS* 1996; 93(14):6898-6901.
- (34) Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 1997; 387(6632):516-519.
- (35) Kharbanda S, Pandey P, Jin S, Inoue S, Bharti A, Yuan ZM, Weichselbaum R, Weaver D, Kufe D. Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 1997; 386(6626):732-735.
- (36) Raitano AB, Whang YE, Sawyers CL. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333(3):F201-F216.
- (37) Welch PJ, Wang JY. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 1993; 75(4):779-790.
- (38) Lewis J, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz M, Wang J. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and  $\alpha$ cytoplasmic-nuclear transport. *PNAS* 1996; 93(26):15174-15179.
- (39) Campbell ML, Li W, Arlinghaus RB. P210 BCR-ABL is complexed to P160 BCR and ph-P53 proteins in K562 cells. *Oncogene* 1990; 5(5):773-776.
- (40) Lin F, Monaco G, Sun T, Liu J, Lin H, Stephens C, Belmont J, Arlinghaus RB. BCR gene expression blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a mouse model. *Oncogene* 2001; 20(15):1873-1881.
- (41) Tauchi T, Miyazawa K, Feng GS, Broxmeyer HE, Toyama K. A Coiled-coil Tetramerization Domain of BCR-ABL Is Essential for the Interactions of SH2-containing Signal Transduction Molecules. *J Biol Chem* 1997; 272(2):1389-1394.
- (42) Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(3):164-172.
- (43) Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 1994; 13(4):764-773.
- (44) Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, Nishida E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 2006.
- (45) Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, Sawyers CL. The Bcr-Abl Leukemia Oncogene Activates Jun Kinase and Requires Jun for Transformation. *PNAS* 1995; 92(25):11746-11750.
- (46) Chow S, Minden MD, Hedley DW. Constitutive phosphorylation of the S6 ribosomal protein via mTOR and ERK signaling in the peripheral blasts of acute leukemia patients. *Experimental Hematology* 2006; 34(9):1182-1190.
- (47) Delgado MD, Vaque JP, Arozarena I, Lopez-Ilasaca MA, Martinez C, Crespo P, Leon J. H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* 2000; 19(6):783-790.
- (48) Crespo P, Leon J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(11):1613-1636.
- (49) Vaque JP, Navascues J, Shiio Y, Laiho M, Ajenjo N, Mauleon I, Matallanas D, Crespo P, Leon J. Myc Antagonizes Ras-mediated Growth Arrest in Leukemia Cells through the Inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 Pathway. *J Biol Chem* 2005; 280(2):1112-1122.
- (50) Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 1996; 12(4):839-846.
- (51) Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 1994; 269(37):22925-22928.
- (52) Kharas MG, Fruman DA. ABL Oncogenes and Phosphoinositide 3-Kinase: Mechanism of Activation and Downstream Effectors. *Cancer Res* 2005; 65(6):2047-2053.



- (53) Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K, Kasuga M. PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J* 1999; 18(2):386-395.
- (54) Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT. A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells. *Cancer Res* 2000; 60(13):3504-3513.
- (55) Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 2006; 25(48):6361-6372.
- (56) Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *PNAS* 2001; 98(17):9666-9670.
- (57) Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006; 25(48):6416-6422.
- (58) Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282(5392):1318-1321.
- (59) Ly C, Arechiga AF, Melo JV, Walsh CM, Ong ST. Bcr-Abl Kinase Modulates the Translation Regulators Ribosomal Protein S6 and 4E-BP1 in Chronic Myelogenous Leukemia Cells via the Mammalian Target of Rapamycin. *Cancer Res* 2003; 63(18):5716-5722.
- (60) Burchert A, Wang Y, Cai D, von Bubnoff N, Paschka P, Muller-Brusselbach S, Ottmann OG, Duyster J, Hochhaus A, Neubauer A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 2005; 19(10):1774-1782.
- (61) Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 1992; 69(7):1227-1236.
- (62) Jayaraman T, Marks AR. Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. *J Biol Chem* 1993; 268(34):25385-25388.
- (63) Ikezoe T, Nishioka C, Bandobashi K, Yang Y, Kuwayama Y, Adachi Y, Takeuchi T, Koeffler HP, Taguchi H. Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Research In Press, Corrected Proof*.
- (64) Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 1992; 358(6381):70-73.
- (65) Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247(4944):824-830.
- (66) Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990; 247(4946):1079-1082.
- (67) Seipelt G, Hoelzer D. [Current aspects of therapy in chronic and acute leukemias]. *Schweiz Med Wochenschr* 1995; 125(27-28):1354-1363.
- (68) Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 2000; 105(1):3-7.
- (69) Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(1):139-145.
- (70) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2(5):561-566.
- (71) Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Regenass U, Lydon NB. Selective Inhibition of the Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction Pathway by a Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class. *PNAS* 1995; 92(7):2558-2562.
- (72) Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl Protein-Tyrosine Kinase in Vitro and in Vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivative. *Cancer Res* 1996; 56(1):100-104.
- (73) Gambacorti-Passerini C, Le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23(3):380-394.
- (74) Paterson SC, Smith KD, Holyoake TL, Jorgensen HG. Is there a cloud in the silver lining for imatinib? *Br J Cancer* 2003; 88(7):983-987.
- (75) Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MWN, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben Am M, Gathmann I,

- Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 2002; 99(10):3530-3539.
- (76) Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Lowenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21(24):4642-4649.
- (77) Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin Hematol* 2003; 40(2 Suppl 2):69-79.
- (78) Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett* 2007; 249(2):121-132.
- (79) Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, Muller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16:2190-2196.
- (80) Khorashad JS, Anand M, Marin D, Saunders S, Al Jabary T, Iqbal A, Margerison S, Melo JV, Goldman JM, Apperley JF, Kaeda J. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 2006; 20(4):658-663.
- (81) Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Lin H, Arlinghaus R, Aggarwal B, Shishodin S, Albitar M, Hayes K, Kantarjian H, Talpaz M. Imatinib Mesylate Resistance Through BCR-ABL Independence in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Res* 2004; 64(2):672-677.
- (82) Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. Wiley-Liss 1995;(2nd edition):38.
- (83) Bacher U, Haeflrich T, Hiddemann W, Schnittger S, Kern W, Schoch C. Additional clonal abnormalities in Philadelphia-positive ALL and CML demonstrate a different cytogenetic pattern at diagnosis and follow different pathways at progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 157(1):53-61.
- (84) Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Krahe R. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *PNAS* 2001; 98(3):1124-1129.
- (85) Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96(3):1070-1079.
- (86) Tipping AJ, Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate. *Exp Hematol* 2003; 31(11):1073-1080.
- (87) Ohmine K, Nagai T, Tarumoto T, Miyoshi T, Muroi K, Mano H, Komatsu N, Takaku F, Ozawa K. Analysis of Gene Expression Profiles in an Imatinib-Resistant Cell Line, KCL22/SR. *Stem Cells* 2003; 21(3):315-321.
- (88) Ferrari G, Pastorelli R, Buchi F, Spinelli E, Gozzini A, Bosi A, Santini V. Comparative Proteomic Analysis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells: Inside the Mechanism of Imatinib Resistance. *J Proteome Res* 2007; 6(1):367-375.
- (89) Hipler UC, Fischer TW, Elsner P. HaCaT cell proliferation influenced by melatonin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16(6):379-385.
- (90) Hohmann H, Michel S, Reiber W, Kahler C, Claussen U, von Eggeling F. Cultivation of fetal erythroid precursors from maternal blood: isolation and characterization by PCR and FISH. *Int J Mol Med* 2002; 10(3):257-261.
- (91) Carter NP. Cytogenetic analysis by chromosome painting. *Cytometry* 1994; 18(1):2-10.
- (92) Kuechler A, Neubauer S, Grabenbauer GG, Claussen U, Liehr T, Sauer R, Wendt TG. Is 24-color FISH detection of in-vitro radiation-induced chromosomal aberrations suited to determine individual intrinsic radiosensitivity? *Strahlenther Onkol* 2002; 178(4):209-215.
- (93) Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84(3-4):156-160.
- (94) Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002; 9(4):335-339.
- (95) Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, Leachman SA, Dirk NR, Wittwer CT, Perreard L, Bernard PS. Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2005; 104(8):1678-1686.
- (96) Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990; 96(1):23-28.
- (97) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-5467.
- (98) Ricci C, Scappini B, Divoky V, Gatto S, Onida F, Verstovsek S, Kantarjian HM, Beran M. Mutation in the ATP-binding Pocket of the ABL Kinase Domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive Cell Line. *Cancer Res* 2002; 62(21):5995-5998.

- (99) Kumagai A, Namba H, Takakura S, Inamasu E, Saenko VA, Ohtsuru A, Yamashita S. No Evidence of ARAF, CRAF and MET Mutations in BRAF(T1799A) Negative Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocr J* 2006.
- (100) Kang D, Song Gho Y, Suh M, Kang h. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Society* 2002; 23(11):1511-1512.
- (101) Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Koscielny S, Wiesner A, Bogumil R, Moller U, Osterloh D, Halbhauer KJ, von Eggeling F. A Technical Triade for Proteomic Identification and Characterization of Cancer Biomarkers. *Cancer Res* 2004; 64(12):4099-4104.
- (102) von Eggeling F, Junker K, Fiedle W, Wollscheid V, Durst M, Claussen U, Ernst G. Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis* 2001; 22(14):2898-2902.
- (103) von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques* 2000; 29(5):1066-1070.
- (104) Kriegova E, Melle C, Kolek V, Hutyrova B, Mrazek F, Bleul A, du Bois RM, von Eggeling F, Petrek M. Protein Profiles of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(10):1145-1154.
- (105) Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Koscielny S, Wiesner A, Bogumil R, Moller U, Osterloh D, Halbhauer KJ, von Eggeling F. Biomarker Discovery and Identification in Laser Microdissected Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with ProteinChip(R) Technology, Two-dimensional Gel Electrophoresis, Tandem Mass Spectrometry, and Immunohistochemistry. *Mol Cell Proteomics* 2003; 2(7):443-452.
- (106) Alessi DR, Cohen P, Ashworth A, Cowley S, Leever SJ, Marshall CJ. Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol* 1995; 255:279-290.
- (107) Keilhack H, Tenev T, Nyakatura E, Godovac-Zimmermann J, Nielsen L, Seedorf K, Bohmer FD. Phosphotyrosine 1173 $\alpha$  Mediates Binding of the Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 to the Epidermal Growth Factor Receptor and Attenuation of Receptor Signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(38):24839-24846.
- (108) Rubio I. Use of the Ras binding domain of c-Raf for biochemical and live-cell analysis of Ras activation. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 4):662-663.
- (109) Scholl S, Krause C, Loncarevic IF, Muller R, Kunert C, Wedding U, Sayer HG, Clement JH, Hoffken K. Specific detection of Flt3 point mutations by highly sensitive real-time polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia. *J Lab Clin Med* 2005; 145(6):295-304.
- (110) Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(1):89-94.
- (111) Rosenhahn J, Weise A, Michel S, Hennig K, Hartmann I, Schiefner J, Schubert K, Liehr T, von Eggeling F, Loncarevic IF. Cytogenetic characterisation and proteomic profiling of the Imatinib-resistant cell line KCL22-R. *Int J Oncol* 2007; 31(1):121-128.
- (112) Baumann M, Golabek A, Lalowski M, Wisniewski T. Micropreparative gel electrophoresis of low-molecular-weight peptides: purification of highly insoluble amyloid peptide fragments. *Anal Biochem* 1996; 236(2):191-198.
- (113) Rimoldi D, Salvi S, Lienard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, Cerottini JC. Lack of BRAF Mutations in Uveal Melanoma. *Cancer Res* 2003; 63(18):5712-5715.
- (114) Tipping AJ, Mahon FX, Lagarde V, Goldman JM, Melo JV. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 2001; 98(13):3864-3867.
- (115) Higashi T, Tsukada J, Kato C, Iwashige A, Mizobe T, Machida S, Morimoto H, Ogawa R, Toda Y, Tanaka Y. Imatinib mesylate-sensitive blast crisis immediately after discontinuation of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia: report of two cases. *Am J Hematol* 2004; 76(3):275-278.
- (116) Hochhaus A, La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004; 18(8):1321-1331.
- (117) Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98(6):1732-1738.
- (118) Reid AG, Huntly BJP, Hennig E, Niederwieser D, Campbell LJ, Bown N, Telford N, Walker H, Grace CD, Deininger MW, Green AR, Nacheva EP. Deletions of the derivative chromosome 9 do not account for the poor prognosis associated with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99(6):2274-2275.
- (119) Gribble SM, Reid AG, Roberts I, Grace C, Green AR, Nacheva EP. Genomic imbalances in CML blast crisis: 8q24.12-q24.13 segment identified as a common region of over-representation. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37(4):346-358.
- (120) Nagy B, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T, Edgren H, Ferrer A, Vilpo J, Elonen E, Vetterranta K, Franssila K, Knuutila S. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 120(3):434-441.
- (121) Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 1984; 223(4640):1028-1033.

- (122) Yang M, Chen T, Han C, Li N, Wan T, Cao X. Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318(3):792-799.
- (123) Wang Y, Chen T, Han C, He D, Liu H, An H, Cai Z, Cao X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* 2007; 110(3):962-971.
- (124) Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(7):902-920.
- (125) Zou L, Wu Y, Pei L, Zhong D, Gen M, Zhao T, Wu J, Ni B, Mou Z, Han J, Chen Y, Zhi Y. Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. *Leuk Res* 2005.
- (126) Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:345-382.
- (127) Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouee A, Koteliensky V, Babinet C, Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 1998; 111(13):1897-1907.
- (128) Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 2004; 117(6):919-932.
- (129) Ferrari S, Battini R, Kaczmarek L, Rittling S, Calabretta B, de Riel JK, Philiponis V, Wei JF, Baserga R. Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6(11):3614-3620.
- (130) Mata F, Rius C, Cabanas C, Bernabeu C, Aller P. S-phase inhibitors induce vimentin expression in human promonocytic U-937 cells. *FEBS Lett* 1989; 259(1):171-174.
- (131) Honke K, Wada Y. Regulation of vimentin expression and protease-mediated vimentin degradation during differentiation of human monocytic leukemia cells. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88(5):484-491.
- (132) Tzivion G, Luo ZJ, Avruch J. Calyculin A-induced Vimentin Phosphorylation Sequesters 14-3-3 and Displaces Other 14-3-3 Partners in Vivo. *J Biol Chem* 2000; 275(38):29772-29778.
- (133) Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS. Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 2000; 351(Pt 1):151-159.
- (134) Janosch P, Kieser A, Eulitz M, Lovric J, Sauer G, Reichert M, Gounari F, Buscher D, Baccarini M, Mischak H, Kolch W. The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments. *FASEB J* 2000; 14(13):2008-2021.
- (135) Arya R, Mallik M, Lakhota SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007; 32(3):595-610.
- (136) Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5(22):2592-2601.
- (137) Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, Ribeil JA, Claverol S, Bonneau M, Moreau-Gaudry F, Guyonnet-Duperat V, Hermine O, Melo JV, Dupouy M, Turcq B, Mahon FX, Pasquet JM. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 21(1):93-101.
- (138) Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* 1992; 267(2):794-803.
- (139) Goldman JM. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. *Exp Hematol* 2004; 32(1):2-10.
- (140) Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):15-27.
- (141) Zhang MH, Lee JS, Kim HJ, Jin DI, Kim JI, Lee KJ, Seo JS. HSP90 protects apoptotic cleavage of vimentin in geldanamycin-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 281(1):111-121.
- (142) Peng C, Li D, Li S. Heat shock protein 90: a potential therapeutic target in leukemic progenitor and stem cells harboring mutant BCR-ABL resistant to kinase inhibitors. *Cell Cycle* 2007; 6(18):2227-2231.
- (143) Bonapace G, Iuliano F, Molica S, Peta A, Strisciuglio P. Cytosolic carbonic anhydrase activity in chronic myeloid disorders with different clinical phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689(3):179-181.
- (144) Leppilampi M, Koistinen P, Savolainen ER, Hannuksela J, Parkkila AK, Niemela O, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, Rajaniemi H. The Expression of Carbonic Anhydrase II in Hematological Malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8(7):2240-2245.
- (145) Whyte MP. Carbonic anhydrase II deficiency. *Clin Orthop Relat Res* 1993;(294):52-63.
- (146) Notari M, Neviani P, Santhanam R, Blaser BW, Chang JS, Galletta A, Willis AE, Roy DC, Caligiuri MA, Marcucci G, Perrotti D. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood* 2006; 107(6):2507-2516.
- (147) Khalil AA. Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci* 2007; 98(2):201-213.

- (148) Mazzocco M, Arrigo P, Egeo A, Maffei M, Vergano A, Di Lisi R, Ghiotto F, Ciccone E, Cinti R, Ravazzolo R, Scartezzini P. A novel human homologue of the SH3BGR gene encodes a small protein similar to Glutaredoxin 1 of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(2):540-545.
- (149) Majid SM, Liss AS, You M, Bose HR. The suppression of SH3BGR1 is important for v-Rel-mediated transformation. *Oncogene* 2005.
- (150) Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, Grant S. Pharmacologic Mitogen-activated Protein/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitors Interact Synergistically with STI571 to Induce Apoptosis in Bcr/Abl-expressing Human Leukemia Cells. *Cancer Res* 2002; 62(1):188-199.
- (151) LoRusso PM, Adjei AA, Varterasian M, Gadgeel S, Reid J, Mitchell DY, Hanson L, DeLuca P, Bruzek L, Piens J, Asbury P, Van Becelaere K, Herrera R, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23(23):5281-5293.
- (152) Blagosklonny MV. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia* 2002; 16(4):455-462.
- (153) Sigoillot FD, Berkowski JA, Sigoillot SM, Kotsis DH, Guy HI. Cell Cycle-dependent Regulation of Pyrimidine Biosynthesis. *J Biol Chem* 2003; 278(5):3403-3409.
- (154) Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS, Evans DR. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 2000; 403(6767):328-332.
- (155) Toothaker LE, Gonzalez DA, Tung N, Lemons RS, Le Beau MM, Arnaout MA, Clayton LK, Tenen DG. Cellular myosin heavy chain in human leukocytes: isolation of 5' cDNA clones, characterization of the protein, chromosomal localization, and upregulation during myeloid differentiation. *Blood* 1991; 78(7):1826-1833.
- (156) Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo NC, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, d'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, Glucksman MJ, Aliprandis E, Bizzaro N, Desnick RJ, Martignetti JA. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000; 26(1):103-105.
- (157) Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Amemiya N, Choi YM, Hosaka N, Inoue M, Jung Y, Mamiya S, Matsumoto K, Miyajima Y, Zhang G, Ruan C, Saito K, Song KS, Yoon HJ, Kamiya T, Saito H. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J Hum Genet* 2001; 46(12):722-729.
- (158) Chen Z, Naveiras O, Balduini A, Mammoto A, Conti MA, Adelstein RS, Ingber D, Daley GQ, Shivdasani RA. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood* 2007; 110(1):171-179.
- (159) Helfman DM, Pawlak G. Myosin light chain kinase and acto-myosin contractility modulate activation of the ERK cascade downstream of oncogenic Ras. *J Cell Biochem* 2005; 95(5):1069-1080.
- (160) Wheeler M, Domin J. Recruitment of the Class II Phosphoinositide 3-Kinase C2{beta} to the Epidermal Growth Factor Receptor: Role of Grb2. *Mol Cell Biol* 2001; 21(19):6660-6667.
- (161) Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J. Class II Phosphoinositide 3-Kinases Are Downstream Targets of Activated Polypeptide Growth Factor Receptors. *Mol Cell Biol* 2000; 20(11):3817-3830.
- (162) Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, Mori M, Kirito K, Kikuchi S, Liu Q, Tauchi T, Miyazawa K, Endo H, Nagai T, Ozawa K. A Member of Forkhead Transcription Factor FKHRL1 Is a Downstream Effector of STI571-induced Cell Cycle Arrest in BCR-ABL-expressing Cells. *J Biol Chem* 2003; 278(8):6411-6419.
- (163) Adjei AA. Novel Combinations Based on Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14):4446s-4450.
- (164) Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G. Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK Pathways: SUSTAINED ACTIVATION OF JNK BLOCKS ERK ACTIVATION BY MITOGENIC FACTORS. *J Biol Chem* 2003; 278(29):26715-26721.

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Julia Rosenhahn,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist;

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe;

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bei meiner Promotion haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts folgende Personen unterstützt: PD Dr. Ferdinand von Eggeling, PD Dr. Ignacio Rubio, Dr. Christina Uta Hipler, Dr. Ivan F. Loncarevic

Jena, den

---

Julia Rosenhahn

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Julia Rosenhahn  
Erich-Weinert-Str. 12  
07749 Jena  
Tel.: 0163/7352447

Geboren am: 27.02.1980 in: Halle

### Schulausbildung

1986-1990

Grundschule, Brehna

1990-1998

Walter-Rathenau-Gymnasium Bitterfeld  
Abschluß: **Abitur**

### Studium

1998-2000

Technische Universität Braunschweig  
Studium der Biologie  
Abschluß: **Vordiplom**

2000-2004

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Studium der Biologie  
Abschluß: **Diplom-Biologin**

Schwerpunkte: Allgemeine Zoologie, Anthropologie, Neurobiologie

2003-2004

Diplomarbeit am Institut für Humangenetik mit dem Thema:  
„Expressionsniveau des nicht-translatierten, tumorspezifischen  
Transkripts ABL-BCR und seine Relevanz für die Bestimmung der  
Tumorlast bei chronischer myeloischer Leukämie (CML)“

### Berufspraxis

Januar 2004-August 2007

Institut für Humangenetik, Klinikum der Friedrich-Schiller-  
Universität Jena

#### **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**

Dissertation zum Thema: Charakterisierung des Einflusses von  
Imatinib und Interferon auf die Proteinexpression von  
Leukämiezelllinien mit ProteinChip (SELDI) Technologie“

seit September 2007

Betreuung des Bereiches der molekulargenetischen Diagnostik im  
Institut für Humangenetik der FSU Jena

### Sprachen

Deutsch, Muttersprache  
Englisch, konversationsfähig  
Russisch, Grundkenntnisse

### EDV-Kenntnisse

MS Word, Excel, PowerPoint, Access  
Ciphergen Express ProteinChip Software  
Image J zur Expressionsanalyse von Proteinen  
Frontpage, EGO-CMS

## 12 Liste wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Rosenhahn J, Schnettler R, Kosmehl H: mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular tenascin-C in different phases of human fracture healing. *Calcified Tissue International* 2008, *accepted for publication 04/2008*

Murzik U, Hemmerich P, Weidtkamp-Peters S, Ulbricht T, Bussen W, Rosenhahn J, von Eggeling F, Melle C: RAB54B targeting to DNA double-strand break repair sites requires complex formation with S100A11. *Mol. Biol. Cell*, *accepted for publication 04/2008*

Rosenhahn J, Weise A, Michel S, Hennig K, Hartmann I, Schiefner J, Schubert K, Liehr T, von Eggeling F and Loncarevic IF: Cytogenetic characterisation and proteomic profiling of the Imatinib-resistant cell line KCL22-R. *Int.J Oncol* 31: 121-128, 2007.

Driemel O, Kosmehl H, Rosenhahn J, Berndt A, Reichert TE, Zardi L, and Dahse R: Expression Analysis of Extracellular Matrix Components in Brush Biopsies of Oral Lesions. *Anticancer Research* 27:1565-1570, 2007

Diegmann J, Junker K, Gerstmayer B, Bosio A, Hindermann W, Rosenhahn J and von Eggeling F: Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur.J.Cancer* 41: 1794-1801, 2005.

Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Rosenhahn J, Exner U, Battmann A, Schnettler R and Kosmehl H: Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone. *Bone* 35: 1334-1345, 2004.



## 13 Anhang

### 13.1 Ergebnisse der Sequenzierung von BCR-ABL und Raf

#### 13.1.1 BCR-ABL

Original-Sequenz c-ABL, NCBI: M14752 (ATP-Bindestelle)

**Gelb:** Primersequenzen für die PCR (nach Ricci et al., 98)

Forward: 5' aa gcgcaacaag cccactgtct at 3', Reverse: 5' agga atccagtatc tcagacgaag 3'

**Rot:** Startcodon

```

      atcctt gagatctgcc tgaagctggt gggctgcaaa toccaagaagg ggctgtcctc
421 gtccctccagc tgttatctcg aagaagccct tcagcggcca gtagcatctg actttgagcc
481 tcagggtctg agtgaagccg ctcggttgaa ctccaaggaa aaccttctcg ctggaccacg
541 tgaaaatgac cccaaccttt tcgttgcaact gtatgatctt gtggccagtg gagataaacac
601 tctaagcata actaaagggtg aaaagctccg ggtcttaggc tataatcaca atggggaatg
661 gtgtgaagcc caaaccaaaa atggccaagg ctgggtccca agcaactaca tcacgccagt
721 caacagtctg gagaaacact cctggtacca tgggcctgtg tcccgcaatg ccgctgagta
781 tccgctgagc agcgggatca atggcagctt cttggtgcgt gagagtgaga gcagtcctag
841 ccagaggtcc atctcgctga gatacgaagg gaggtgttac cattacagga tcaacactgc
901 ttctgatggc aagctctacg tctcctccga gagccgcttc aacaccctgg ccgagttggt
961 tcatcatcat tcaacggtgg ccgacgggct catcaccacg ctccattatc cagcccaaaa
1021 gcgcaacaag cccactgtct atgggtgtgc ccccaactac gacaagtggg agatggaacg
1081 cacggacatc accatgaagc acaagctggg cggggggccag tacggggagg tgtacgaggg
1141 cgtgtggaag aaatacagcc tgacggtggc cgtgaagacc ttgaaggagg acaccatgga
1201 ggtggaagag ttcttgaag aagctgcagt catgaaagag atcaaacacc ctaacctagt
1261 gcagctcctt ggggtctgca cccgggagcc cccgttctat atcatcactg agttcatgac
1321 ctacgggaac ctctggact acctgaggga gtgcaaccgg caggaggtga acgccgtggt
1381 gctgctgtac atggccactc agatctcgtc agccatggag tacctgaga agaaaaactt
1441 catccacaga gatcttctg cccgaaactg cctggtaggg gagaaccact tgggtgaagg
1501 agctgatctt ggcctgagca ggttgatgac aggggacacc tacacagccc atgctggagc
1561 caagttcccc atcaaatgga ctgcaccgca gagcctggcc tacaacaagt tctccatcaa
1621 gtccgacgct tgggcatttg gattattgct ttgggaaatt gctacctatg gcatgtcccc
1681 ttacccggga attgaccgtt cccagtgta tgagctgcta gagaaggact accgcatgaa
1741 gcgcccagaa ggctgccag agaaggtcta tgaactcatg cgagcatgtt ggcagtgga
1801 tccctctgac cggccctcct ttgtgaaat ccaccaagcc tttgaaaca tgttccagga
1861 atccagtatc tcagacgaag

```

Das blau unterlegte Nukleotid markiert die Stelle des Basenaustausches. In der Originalsequenz findet sich ein A, während die DNA der Zelllinie KCL22-R ein G aufweist. Mit Hilfe des Translate Tool ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) konnte gezeigt werden, dass der Basenaustausch nicht zu einem Aminosäureaustausch führt. Die Mutation ist neutral, da eine *wobble*-Base betroffen ist und sowohl CTA als auch CTG für die Aminosäure Leucin kodieren.

```

atgttgagagatctgcctgaagctggtgggctgcaaatccaagaaggggctgtcctcgtcc
M L E I C L K L V G C K S K K G L S S S
tccagctgttatctggaagaagcccttcagcggccagtagcatctgactttgagcctcag
S S C Y L E E A L Q R P V A S D F E P Q
ggtctgagtgaaagccgctcggttggaactccaaggaaaaccttctcgtggaccagtgaa
G L S E A A R W N S K E N L L A G P S E
aatgaccccaactcttctgctgactgtatgattttgtggcagtgagataaacactcta
N D P N L F V A L Y D F V A S G D N T L
agcataactaaaggtgaaaagctccgggtcttaggctataatcacaatggggaatgggtg
S I T K G E K L R V L G Y N H N G E W C
gaagcccaaaccaaatggccaaggctgggtcccaagcaactacatcacgcccagtcac
E A Q T K N G Q G W V P S N Y I T P V N
agtctggagaacactctcgtggtaccatgggcctgtgtccgcaatgccgctgagtatccg
S L E K H S W Y H G P V S R N A A E Y P
ctgagcagcgggacttgccagcttcttggtgcgtgagagtgagagcagtcctagccag
L S S G I N G S F L V R E S E S S P S Q
aggtccatctcgtgagatacgaagggagggtgtaccattacaggatcaacactgcttct
R S I S L R Y E G R V Y H Y R I N T A S
gatggcaagctcacgtctcctccgagagccgcttcaacaccctggccgagttggttcat
D G K L Y V S S E S R F N T L A E L V H
catcattcaacggtggccgacgggctcatcaccacgctccattatccagcccaagcgc

```

Rohdaten	Versuch 1			Versuch 2			MW	STABW
Proben	RAB7B	G6PDH	Delta-Ct	RAB7B	G6PDH	Delta-Ct		
S Ko	31,00	21,43	0,001	30,27	21,54	0,002	<b>0,002</b>	0,001
S 1 µM Imatinib	26,38	22,62	0,074	25,10	21,78	0,100	<b>0,087</b>	0,019
R Ko	24,49	21,66	0,141	23,65	20,97	0,156	<b>0,148</b>	0,011
R 1 µM Imatinib	21,59	21,98	1,310	21,35	21,20	0,901	<b>1,106</b>	0,289
Auswertung	Delta-Delta-Ct Ko/Imatinib		MW	STABW	Delta-Delta-Ct KCL22-S/R		MW	STABW
Proben	Versuch 1	Versuch 2				Versuch 1	Versuch 2	
S Ko	56,10	42,52	<b>49,31</b>	<b>9,61</b>	Ko	106,89	66,26	<b>86,57</b>
S 1 µM Imatinib					Imatinib	17,75	9,00	<b>13,38</b>
R Ko	9,32	5,78	<b>7,55</b>	<b>2,50</b>				
R 1 µM Imatinib								

Tabelle 10: Expression von RAB7B zu Aktin bzw. G6PDH in unterschiedlichen Gruppen von Patienten

Patientengruppe	RAB7B/Aktin			RAB7B/G6PDH		
	MW	STABW	Median	MW	STABW	Median
unbehandelt	4,23E-05	7,01E-05	1,38E-05	7,03E-03	1,17E-02	2,98E-03
behandelt	2,22E-05	3,16E-05	1,16E-05	1,53E-02	4,75E-02	2,86E-03
Responder	4,32E-05	6,57E-05	1,38E-05	1,81E-02	4,77E-02	3,54E-03
Nicht-Responder	1,14E-05	8,56E-06	8,76E-06	2,18E-03	1,07E-03	2,47E-03
	1,89E-05	2,16E-05	1,01E-05	4,70E-03	4,76E-03	2,98E-03

Tabelle 11: Zusammensetzung der weiterkultivierten Einzelklone hinsichtlich Monosomie/ Disomie 13q14

Karyotyp-Kombination Klon-Nr./+ - IM	4x8, 1x13	3x8, 1x13	4x8, 2x13	3x8, 2x13	Summe 1x13	Summe 2x13
1+	87%	12%	1%	0%	99%	1%
2+	3%	0%	75%	22%	3%	97%
3+	0%	0%	84%	16%	0%	100%
4+	84%	16%	0%	0%	100%	0%
6+	1%	0%	78%	21%	1%	99%
7+	1%	0%	80%	19%	1%	99%
8+	8%	0%	85%	7%	8%	92%
9+	2%	3%	71%	24%	5%	95%
1-	2%	1%	91%	6%	3%	97%
2-	75%	23%	2%	0%	98%	2%
3-	82%	18%	0%	0%	100%	0%
4-	95%	5%	0%	0%	100%	0%
5-	1%	9%	9%	81%	10%	90%
6-	4%	5%	77%	14%	9%	91%
7-	5%	1%	56%	38%	6%	94%
8-	5%	0%	79%	16%	5%	95%
9-	70%	12%	15%	3%	82%	18%
10-	4%	1%	76%	19%	5%	95%
11-	75%	22%	1%	2%	97%	3%

Tabelle 12: Identifizierte Proteine aus 1DE/QHyperD-Aufreinigung

Proteinname	Score	Sequenzabdeckung	Peptide	MG kDa	pI	S/R
RAP2 interacting protein x	2.43	57%		43.32	5.5	S
homeotic protein HOX C6	1.77	65%		17.98	9.9	S
H <sup>+</sup> -ATPase beta 1 subunit	1.84	33%		47.48	5.4	S
Aldolase A	2.13	25%		39.27	8.8	S
Porphobilinogen deaminase	2.43	34%		39.6	6.7	S
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200kDa helicase	1.58	22%		194.46	6.3	R
Carbonic Anhydrase	2.43	54%		29.07	6.9	R
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1	2.43	42%	13/22	37.4	9	F3 R
p37 TRAP/SMCC/PC2 subunit	2.43	32%	6/12	31.15	9.6	F4 S
mutant beta-actin (beta'-actin)	1.92	30%	9/29	42.22	5.2	F1 S
interleukin 5 receptor alpha-subunit	2.43	30%	4/12	38.22	5.6	F4 S
proteasome 26S ATPase subunit 4 isoform 2	2.43	36%	8/17	43.63	5.1	F4 S
Chain B Merlin, The Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor Protein	2.43	29%	10/13	36.84	8.7	F4 R
PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog	2.43	31%	8/17	59.28	7.1	F4 R
moesin	2.37	31%	12/19	67.94	6.1	F3 S
dJ423N22.1.1 (variant 1)	2.43	23%	10/14	83.62	5.4	F4 R
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	2.43	69%	6/12	10.49	4.8	F4 R
gamma enolase	1.82	38%	8/21	44.18	4.9	F5 S
phosphoglycerate mutase 1	1.87	28%	5/8	28.79	6.7	F5 S
Rho guanine nucleotide exchange factor 5	1.12	22%	8/17	60.04	7.9	F1 S

Tabelle 13: Übersicht aller mittels 2DE identifizierten differentiell exprimierten Proteine

Proteinname	Score	Peptide	MG kDa	pI	S/R
Calreticulin precursor	2,39		48,12	4,3	R
Nucleophosmin	1,81		31,13	4,7	R
Heat Shock Protein 27	2,09		22,8	6	S
Transgelin 2, SM22-alpha	1,91		22,4	8,6	S
nonerythroid alpha-spectrin	1,81		32,07	5,1	S
Chitotriosidase precursor	2,43		43,3	6,9	R
KIAA1043	1,79		173,09	6,3	S
Actin-binding LIM protein	1,7		90,06	9,5	S
cAMP-specific phosphodiesterase HPDE4D3	2,43		77,01	4,9	S
unc119 oder HRG4	2,43		24,31	6,9	R
HLF2 oder Lactoferrin	2,43		77,67	9,2	R
OPA-containing protein	2,43	6/6	225,87	6,3	R
crystallin B3	1,84	3/6	24,38	6,3	R
SH3 domain binding glutamic acid rich protein 3	1,33	5/8	10,42	4,8	R
RAD51 homolog C isoform 3	2,43	5/11	14,96	6,8	R
IgG heavy chain	2,43	4/13	14,16	6,4	R
anti-glycoprotein VI IgG lamda	1,27	3/10	11,63	5,1	R
MHC HLA-DR-beta chain precursor	2,43	3/10	14,4	5,9	R
BDNF/NT-3 oder TrkB	1,67	3/4	91,98	6	S
Lamin A/C	2,43	11/17	65,12	6,4	S
Tubulin alpha 2	2,43	7/17	49,94	5	S
retinal degeneration B beta	2,43	6/11	38,37	6	S
HLA-Cw7	2,43	7/15	40,83	5,8	S
LYK5/STE20-related adaptor protein	1,91	3/6	38,58	6,3	S
Synaptotagmin XII	2,43	5/6	46,66	5,4	S
PA28beta	2,43	10/42	27,56	5,4	S
MAF1	1,85	5/8	28,85	4,5	S
HLA-A*24var	2,43	3/7	22,89	6	S
Titin	2,43	5/10	11,85	7,1	S
IgG heavy chain IgM	1,52	4/8	14,09	6,8	S
NYGGF4	1,37	7/13	28,25	6,5	S
Cystatin B	2,30	6/8	11,16	7,9	S
mitochondrial translational initiation factor 3	2,18	4/5	31,69	9,8	S
PHC2	1,75	3/5	36,3	9,1	S
unnamed protein product	2,43	6/9	33,19	10	S
BCR downstream signaling	1,44	6/9	34,27	7,8	S
heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1	1,17	6/9	34,18	9,4	S
C2f	2,43	4/12	26,53	9,6	S
HDCME13P	2,09	6/11	21,48	9,6	S
Ras-like without CAAX1	1,43	6/11	25,13	9,5	S
VAMP-associated membrane protein A	2,43	4/6	27,58	9,1	S
HSP 70	2,43	7/8	72,32	5,1	R
RBM17	2,43	6/9	41,29	6,1	??
gonadotropin-regulated testicular RNA helicase	2,4	6/9	54,64	5,8	??
Thiamin pyrophosphokinase	2,43	4/8	27,2	5	S
Triseposphate isomerase 1	2,43	3/14	18,86	5,2	S
Vimentin	2,24	10/12	53,7	5	S
Protein disulfide isomerase-associated precursor	2,43	3/9	57,26	6	n.diskr
Enolase	1,48	6/12	47,15	7	S
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	2,43	5/11	35,99	8,7	R
Peroxiredoxin	2,43	5/13	22,09	8,7	R
Carbonic anhydrase	2,28	8/20	29,09	6,9	R
HSP 70	2,34	8/13	73,71	6	R
Vimentin	2,43	8/19	53,7	5	S
RAD23B	2,43	3/6	43,18	4,8	S
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	2,43	6/10	35,99	8,7	R
Carbonic anhydrase	1,4	6/15	28,72	6,6	R
RABEP2	1,4	3/6	59,3	4,8	R
SDC3	2,24	3/9	38,23	4,6	R
TCTP	2,43	3/9	19,58	5	S
Vimentin	2,43	14/19	53,63	5,1	S
Enolase	2,42	11/18	47,15	7	S

**Tabelle 14: Zellproliferation von KCL22-S und -R nach Kombinationstherapie mit CI-10 und Imatinib bestimmt mittels CASY**

Zeitpunkt	Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 5		Tag 8	
Behandlung	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
KCL22-S Co	5,00E+06	3,2E+05	7,33E+06	3,5E+05	8,69E+06	2,1E+04	1,15E+07	2,6E+05	1,45E+07	1,2E+05	1,81E+07	7,1E+03
KCL22-S + CI	4,98E+06	9,5E+04	6,12E+06	4,0E+05	7,21E+06	1,9E+05	1,04E+07	3,5E+05	1,34E+07	5,8E+04	2,10E+07	2,5E+05
KCL22-S + STI	4,65E+06	1,2E+05	4,34E+06	2,0E+05	3,23E+06	5,7E+04	2,48E+06	2,2E+05	2,01E+06	1,2E+05	9,70E+05	5,7E+04
KCL22-S + CI/STI	5,05E+06	3,2E+05	4,35E+06	2,2E+05	3,45E+06	3,9E+04	2,50E+06	1,7E+05	1,90E+06	2,1E+04	7,85E+05	7,8E+04
KCL22-R Co	4,79E+06	2,5E+05	6,39E+06	3,2E+05	7,53E+06	1,3E+05	9,68E+06	3,4E+05	1,02E+07	3,2E+04	1,42E+07	2,8E+05
KCL22-R + CI	4,75E+06	3,3E+05	5,92E+06	1,5E+05	7,21E+06	5,4E+05	9,13E+06	1,4E+05	1,03E+07	6,1E+05	1,40E+07	6,6E+05
KCL22-R + IM	4,65E+06	2,2E+05	6,39E+06	4,2E+04	6,74E+06	7,8E+04	8,00E+06	2,4E+05	9,39E+06	3,6E+05	1,60E+07	1,1E+06
KCL22-R + CI/IM	4,52E+06	3,0E+05	5,29E+06	1,8E+05	4,68E+06	3,5E+04	4,22E+06	4,5E+05	4,13E+06	1,3E+05	2,96E+06	2,2E+05

**Tabelle 15: Messung der Caspase3/7-Aktivität nach Kombinationstherapie mit Imatinib (IM) und CI-1040 (CI) in KCL22-S und -R**

Probe	Messwert	MW	STABW	% Kontrolle
S KO	106,74 103,13	104,94	2,55	
S IM	150,52 168,34	159,43	12,60	152
S + 0,1 µM CI	137,64 140,30	138,97	1,89	132
S IM + 0,1 µM	214,28 204,50	209,39	6,91	199,5
R KO	119,77 111,23	115,50	6,04	
R IM	107,27 106,27	106,77	0,71	92
R + 0,1 µM CI	125,24 124,14	124,69	0,78	109
R IM+ 0,1 µM	97,97 112,07	105,02	9,97	91

**Tabelle 16: mRNA-Expressionsniveau von B-Raf, C-Raf und Erk im Vergleich zu β-Aktin**

Gen	BRAF/Aktin	STABW	CRAF/Aktin	STABW	Erk/Aktin	STABW
KCL22-S	0,00664	0,00105	0,00282	0,00072	0,01501	0,00118
KCL22-R	0,00771	0,00080	0,00390	0,00063	0,01769	0,00276

**Tabelle 17: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Kombinationstherapie mit Imatinib und Rapamycin**

Behandlung	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h		Zelldurchmesser		
	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	% KO
KCL22-S Co	3,92	0,15	4,82	0,31	6,35	0,21	8,67	0,47	13,96	0,17	13,69	0,10	
KCL22-S + IM	3,89	0,15	4,26	0,03	4,93	0,11	4,77	0,21	4,60	0,28	12,66	0,09	92,46
KCL22-S + 0.05 Rapa	4,14	0,08	4,60	0,00	4,83	0,04	5,46	0,25	6,76	0,62	13,11	0,02	95,72
KCL22-S + 0.1 Rapa	4,11	0,06	4,29	0,08	4,20	0,25	4,44	0,17	4,72	0,45	12,81	0,08	93,56
KCL22-S + 0.05 Rapa + IM	3,81	0,04	4,20	0,11	3,65	0,14	3,15	0,04	3,00	0,17	12,30	0,13	89,81
KCL22-S + 0.1 Rapa + IM	3,87	0,21	3,72	0,28	3,35	0,00	2,61	0,21	2,60	0,17	12,32	0,08	90,00
KCL22-R Co	3,71	0,02	4,76	0,06	7,28	0,18	11,83	0,00	15,26	0,83	14,98	0,19	
KCL22-R + IM	3,71	0,02	5,66	0,25	7,05	0,07	10,53	0,46	13,46	0,19	14,44	0,23	96,38
KCL22-R + 0.05 Rapa	3,98	0,06	4,56	0,06	5,73	0,25	7,90	0,05	9,68	0,32	14,28	0,06	95,31
KCL22-R + 0.1 Rapa	4,05	0,08	4,44	0,23	5,73	0,25	8,22	0,14	10,04	0,45	14,25	0,09	95,09
KCL22-R + 0.05 Rapa + IM	3,54	0,13	3,88	0,11	4,83	0,46	6,18	0,37	7,65	0,64	13,88	0,14	92,61
KCL22-R + 0.1 Rapa + IM	3,57	0,04	3,62	0,31	3,73	0,74	3,90	1,10	3,56	0,95	13,07	0,37	87,25

Tabelle 18: Apoptose nach Kombination der verschiedenen Inhibitoren (in % der Kontrolle)

	KCL22-S	KCL22-R
IM	206	90
Rapamycin	133	116
LY294002	340	291
CI-1040	184	105
IM+R	291	91
IM+L	856	292
IM+C	399	100
R+L	399	537
R+C	352	125
L+C	1298	449
R+L+C	1744	423
IM+R+L+C	4183	690

Tabelle 19: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Imatinib-Gabe in Normalmedium (NM) und konditioniertem Medium (KM), gemessene Werte

Mittelwerte	Zellzahl/ml				Zellgröße [µM]			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
S NM Ko	1,46	1,83	1,99	2,44	13,91	13,72	14,05	13,69
S NM IM	1,22	1,03	0,93	0,72	12,79	12,65	12,49	12,28
S KM KO	1,43	1,50	1,61	1,63	13,77	13,61	14,00	13,72
S KM IM	1,35	1,15	1,03	0,89	12,94	13,05	13,11	12,93
R NM KO	1,74	2,04	2,10	2,01	15,53	15,50	15,18	15,20
R NM IM	1,51	1,91	2,02	1,93	15,00	14,91	14,71	14,60
R KM KO	1,47	1,53	1,45	1,39	15,31	15,33	15,03	15,11
R KM IM	1,47	1,55	1,49	1,42	15,07	14,86	14,80	14,58

Tabelle 20: Zellzahl- und Zelldurchmesserentwicklung nach Imatinib-Gabe in Normalmedium (NM) und konditioniertem Medium (KM) als % der Kontrolle

Probe	Zellzahl						Zellgröße					
	24 h	48 h	72 h	96 h	MW	STABW	24 h	48 h	72 h	96 h	MW	STABW
% Kontrolle NM S	83,98	56,57	46,64	29,51	54,18	22,80	91,95	92,22	88,92	89,70	90,70	1,64
% Kontrolle KM S	94,17	76,50	63,64	54,60	72,23	17,17	93,97	95,93	93,64	94,24	94,45	1,02
% Kontrolle NM R	86,97	93,47	96,50	96,02	93,24	4,39	96,59	96,22	96,93	96,05	96,45	0,39
% Kontrolle KM R	100,45	100,87	102,29	102,16	101,44	0,92	98,48	96,93	98,45	96,49	97,59	1,03

Tabelle 21 (Teil 1): Gene in der Region 13q13.1-13q21.1

start	stop	E	Cyto	Description
34414456	35144873	best RefSeq	13q13	neurobeachin
34946340	34948788	best RefSeq	13q13	mab-21-like 1 (C. elegans)
35243478	35603443	best RefSeq	13q13	doublecortin and CaM kinase-like 1
35640354	35686676	best RefSeq	13q13.3	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2
35773775	35818453	best RefSeq	13q13.3	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome)
35904633	35915008	best RefSeq	13q12.3-q13	cyclin A1
35962187	35962578	protein	13q13.3	similar to Histone H2a
36266621	36267187	protein	13q13.3	similar to ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein isoform 1
36291339	36301740	best RefSeq	13q14	regulatory factor X-associated protein
36320321	36351966	best RefSeq	13q12-q14	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)
36398575	36399356	protein	13q13.3	similar to 60S ribosomal protein L29 (Cell surface heparin binding protein HIP)
36410452	36414078	protein	13q13.3	similar to eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1
36421967	36471477	best RefSeq	13q13.3	asparagine-linked glycosylation 5 homolog
36472917	36481538	best RefSeq	13q13.1	exosome component 8
36481631	36531823	best RefSeq	13q13.3	family with sequence similarity 48, member A
36575397	36577803	best RefSeq	13q13.3	casein kinase 1, alpha 1-like
37034779	37070874	best RefSeq	13q13.3	periostin, osteoblast specific factor
37108795	37341935	best RefSeq	13q13.1-q13.2	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4
37465181	37466857	protein	13q13.3	similar to heat shock protein 1 (chaperonin)
37822018	37835140	best RefSeq	13q13.3	ubiquitin-fold modifier 1
38159482	38352924	best RefSeq	13q13.3	FRAS1 related extracellular matrix protein 2
38394836	38425956	protein	13q13.3	similar to ankyrin repeat domain 26
38438062	38462983	best RefSeq	13q13.3	stomatin (EPB72)-like 3
38482002	38510186	best RefSeq	13q13.3	chromosome 13 open reading frame 23
38510455	38522246	best RefSeq	13q13.3	similar to RIKEN cDNA 8030451K01
38815029	39075201	best RefSeq	13q12	lipoma HMGIC fusion partner
39127814	39224633	best RefSeq	13q13.3	component of oligomeric golgi complex 6
40027817	40138734	best RefSeq	13q14.1	forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)
40201433	40243293	best RefSeq	13q14.11	mitochondrial ribosomal protein S31
40261597	40282246	best RefSeq	13q14	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15
40282901	40282996	external	13q14.11	microRNA 621
40335730	40336042	best RefSeq	13q14.11	cytochrome c, somatic pseudogene 34
40404164	40454418	best RefSeq	13q13	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)
40533697	40556139	best RefSeq	13q14.11	WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)
40599709	40604936	best RefSeq	13q14.11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6
40640629	40643841	best RefSeq	13q32	calmodulin 2 pseudogene 3
40663711	40666702	best RefSeq	13q14.11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7
40688516	40735713	best RefSeq	13q14.1-q14.3	mitochondrial translational release factor 1
40758815	40760475	best RefSeq	13q14.11	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 pseudogene 3
40783418	40849162	best RefSeq	13q14.11	NMDA receptor regulated 1-like
40856150	40857286	mRNA	13q14.11	similar to tubulin, beta 5
40903400	40904394	best RefSeq	13q13.3	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 36 pseudogene
40911973	40912998	best RefSeq	13q14.11	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 155 pseudogene
40915060	40915723	best RefSeq	13q14.11	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 37 pseudogene
40929712	40943007	best RefSeq	13q14.11	response gene to complement 32
41520889	41701888	best RefSeq	13q14.11	diacylglycerol kinase, eta
41539846	41543990	best RefSeq	13q14.13	mitogen-activated protein kinase 6 pseudogene 3
41724565	41728711	mRNA	13q14.11	similar to Fumarate hydratase, mitochondrial precursor (Fumarase)
41744289	41795402	best RefSeq	13q14.11	A kinase (PRKA) anchor protein 11
41841350	41841793	best RefSeq	13q13-q14	fatty acid binding protein 3, pseudogene 2
42043795	42080148	best RefSeq	13q14	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
42360122	42464377	best RefSeq	13q13.3	epithelial stromal interaction 1 (breast)
42495362	42581306	best RefSeq	13q14.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15
42685704	43139655	best RefSeq	13q14.11	proliferation-inducing protein 38
43440482	43443843	best RefSeq	13q14.11	diacylglycerol kinase, zeta-like

Tabelle 21 (Teil 2): Gene in der Region 13q13.1-13q21.1

start	stop	E	Cyto	Description
43440482	43443843	best RefSeq	13q14.11	diacylglycerol kinase, zeta-like
43845978	43869850	best RefSeq	13q14.11	chromosome 13 open reading frame 21
43905658	44048701	best RefSeq	13q14	TSC22 domain family, member 1
44066994	44068293	mRNA	13q14.11	similar to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin
44271639	44281766	mRNA	13q14.11	hypothetical protein LOC144817
44411384	44461571	best RefSeq	13q14	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1
44461687	44500405	best RefSeq	13q13-q14	KIAA1704
44592672	44756237	best RefSeq	13q14	general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa
44664988	44666852	best RefSeq	13q14.12	potassium channel tetramerisation domain containing 4
44809304	44813297	best RefSeq	13q12-q14	tumor protein, translationally-controlled 1
44809615	44809744	best RefSeq	13q14.13	small nucleolar RNA, H/ACA box 31
44861311	44864670	mRNA	13q14.12	similar to Reticulocalbin-1 precursor
44868044	44890515	best RefSeq	13q14.12	solute carrier family 25, member 30
44908257	44908798	protein	13q14.12	similar to peptidylprolyl isomerase A isoform 1
44937072	45008761	best RefSeq	13q14.12	component of oligomeric golgi complex 3
45142805	45144531	protein	13q14.12	similar to Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1, mitochondrial precursor (CCO1)
45159721	45160608	protein	13q14.12	similar to Aldose reductase (AR) (Aldehyde reductase)
45174447	45186694	best RefSeq	13q14.12	spermatid associated
45251364	45323758	best RefSeq	13q14.12	similar to seven in absentia 2
45434315	45524895	best RefSeq	13q14.12	zinc finger CCCH-type containing 13
45525323	45577169	best RefSeq	13q14.11	carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)
45598060	45654395	best RefSeq	13q14.3	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
45684084	45722643	best RefSeq	13q14.12	similar to Leucine-rich repeat protein SHOC-2 (Ras-binding protein Sur-8)
45742213	45742758	protein	13q14.12	similar to CG9288-PA
45909639	45910326	mRNA	13q14.13	similar to protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2
45932671	45933344	best RefSeq	13q14.13	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 101 pseudogene
45963066	45963257	best RefSeq	13q14-q21	COX17 pseudogene
46025304	46215731	best RefSeq	13q14.13-q14	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1
46243392	46269368	best RefSeq	13q14.1-q14	esterase D/formylglutathione hydrolase
46305514	46368176	best RefSeq	13q14-q21	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
47235596	47355417	mRNA	13q14.2	similar to Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP-1-related protein) (hNRP)
47414792	47473463	best RefSeq	13q12.2-q13	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit
47509704	47519283	best RefSeq	13q14.2	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
47548093	47567241	best RefSeq	13q14.2	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 4 homolog (S. cerevisiae)
47705307	47734228	best RefSeq	13q14.3	integral membrane protein 2B
47775912	47954023	best RefSeq	13q14.2	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
47883275	47887947	best RefSeq	13q14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5
47961100	48005317	best RefSeq	13q14.3	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing 1
48178952	48181499	best RefSeq	13q14.12-q14	cysteinyl leukotriene receptor 2
48243233	48244007	best RefSeq	13q13	proteasome activator subunit 2 pseudogene
48448940	48681730	best RefSeq	13q14.2	fibronectin type III domain containing 3A
48515974	48518931	best RefSeq	13q14	RAD17 homolog (S. pombe) pseudogene 2
48659616	48659805	best RefSeq	13q14-q21	cytochrome c oxidase subunit VIIc pseudogene 1
48692475	48694514	best RefSeq	13q14-q21	motilin receptor
48720099	48765619	best RefSeq	13q14.2	cytidine and dCMP deaminase domain containing 1
48781945	48873500	best RefSeq	13q14.2	calcium binding protein 39-like
48916511	48964299	best RefSeq	13q14	SET domain, bifurcated 2
48967802	49001118	best RefSeq	13q14.3	PHD finger protein 11
49004083	49057720	best RefSeq	13q14	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing 1
49100436	49106009	best RefSeq	13q14.3	ADP-ribosylation factor-like 11
49132863	49163612	best RefSeq	13q12-q13	emopamil binding protein-like
49171462	49265058	best RefSeq	13q14.3	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)
49264668	49268486	protein	13q14.3	similar to karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)
49362650	49365298	mRNA	13q14.3	similar to Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 5 (cTAGE-5 protein) (cTAGE-5)
49454689	49597678	best RefSeq	13q14.3	deleted in lymphocytic leukemia, 2
49469144	49490604	best RefSeq	13q14	ret finger protein 2
49487391	49493059	best RefSeq	13q14.3	potassium channel regulator
49521109	49521197	external	13q14.3	microRNA 16-1
49521255	49521337	external	13q14.3	microRNA 15a



Tabelle 21 (Teil 3): Gene in der Region 13q13.1-13q21.1

start	stop	E	Cyto	Description
49554415	49577434	best RefSeq	13q14.3	deleted in lymphocytic leukemia, 1
49644155	49645753	best RefSeq	13q14.3	family with sequence similarity 10, member A4
50184038	50316076	best RefSeq	13q14.3	deleted in lymphocytic leukemia, 7
50381928	50428901	best RefSeq	13q14.3	deleted in lymphocytic leukemia 8
50466648	50538143	best RefSeq	13q14.2-q14.3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2
50633839	50634494	protein	13q14.3	similar to ribosomal protein L5
50694508	50753617	best RefSeq	13q14.3	hypothetical protein FLJ30707
50807910	50834134	mRNA	13q14.3	nexin-related serine protease inhibitor
50833702	50925276	best RefSeq	13q14.12-q14.2	integrator complex subunit 6
50931097	50933768	mRNA	13q14.3	similar to 40S ribosomal protein S4, X isoform
51056645	51232136	best RefSeq	13q14.3	WD repeat and FYVE domain containing 2
51334147	51338373	best RefSeq	13q14.3	coiled-coil domain containing 70
51379954	51382817	mRNA	13q14.3	CTAGE family, member 3
51404806	51483631	best RefSeq	13q14.3	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide
51438815	51439482	mRNA	13q14.3	similar to Fatty acid-binding protein, epidermal (E-FABP)
51484551	51501781	best RefSeq	13q14.2	asparagine-linked glycosylation 11 homolog
51496828	51505702	best RefSeq	13q14.2	UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast)
51536899	51601215	best RefSeq	13q14.3	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 5
51604780	51631933	best RefSeq	13q14.13	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3
51639848	51666603	best RefSeq	13q14.3	thrombospondin, type I, domain containing 1 pseudogene
51691664	51806485	mRNA	13q14.3	similar to TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase isoform g
51849303	51878321	best RefSeq	13q14.3	thrombospondin, type I, domain containing 1
51884738	51922764	best RefSeq	13q14.3	vacuolar protein sorting 36 (yeast)
51927597	51948758	best RefSeq	13q14	cytoskeleton associated protein 2
51961129	52059226	best RefSeq	13q14.3	TPTE pseudogene
52089606	52115920	best RefSeq	13q14.3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like
52125002	52160434	best RefSeq	13q14.3	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)
52175400	52211948	best RefSeq	13q14-q21	leukocyte cell derived chemotaxin 1
52292633	52293154	protein	13q21.1	similar to peptidyl-Pro cis trans isomerase
52316110	52320775	best RefSeq	13q14.3-q21.1	protocadherin 8
52500973	52524193	best RefSeq	13q21.1	olfactomedin 4
53912783	53925566	mRNA	13q21.1	similar to ribosomal protein L13a; 60S ribosomal protein L13a; 23 kD highly
56613053	56616074	best RefSeq	13q21.1	FLJ40296 protein
57103945	57199243	best RefSeq	13q21.1	protocadherin 17